UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1934-1935

N° 81

LA CULTURE
DE
L'« ENTAMŒBA HISTOLYTICA »

Travail du Laboratoire de Médecine Coloniale (Professeur H. BONNIN)

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 19 Décembre 1934

PAR

Jean-Barthélemy-Eugène COURDURIER

Elève du Service de Santé de la Marine.
Préparateur à la Faculté de Médecine.
Diplômé de Médecine coloniale de la Faculté de Bordeaux.
Né le 12 décembre 1908, à Toulon (Var).

Examinateurs de la Thèse :

MM. BONNIN, professeur..... *Président.*
MANDOUL, professeur ..... *Juges*
DE GRAILLY, agrégé..... *Juges*
FONTAN, agrégé ..... *Juges*

BORDEAUX

Imprimerie J. BIÈRE, 18-20-22, rue du Peugue

1934

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543914_0024

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1934-1935

N° 81

LA CULTURE
DE
L'« ENTAMŒBA HISTOLYTICA »

Travail du Laboratoire de Médecine Coloniale (Professeur H. BONNIN)

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 19 Décembre 1934

PAR

Jean-Barthélemy-Eugène COURDURIER

Elève du Service de Santé de la Marine.
Préparateur à la Faculté de Médecine.
Diplômé de Médecine coloniale de la Faculté de Bordeaux.
Né le 12 décembre 1908, à Toulon (Var).

Examinateurs de la Thèse :

MM. BONNIN, professeur..... *Président.*
MANDOUL, professeur ..... *Juges*
DE GRAILLY, agrégé..... *Juges*
FONTAN, agrégé ..... *Juges*

BORDEAUX

Imprimerie J. BIÈRE, 18-20-22, rue du Peugue

1934

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Doyen ..... M. MAURIAC
Assesseur ..... M. GUYOT
Doyen honoraire ..... M SIGALAS

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. POUSSON, MOURE, W. DUBREUILH
RIVIÈRE, BARTHE, DENIGES, SELLIER, BEILLE, CASSAET, CHAVANNAZ, PACHON

PROFESSEURS

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC, DUPÉRIÉ	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ROCHER
Clinique chirurgicale	BEGOUIN.	Clinique médicale des maladies des enfants	CRUCHET
Clinique chirurgicale et gynécologique	GUYOT.	Chimie biologique et médicale	DELAUNAY
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Physique médicale et pharmaceutique	SIGALAS.
Clinique d'accouchements	ANDERODIAS.	Médecine coloniale et clinique des maladies exotiques	BONNIN
Anatomie pathologique et microscopie clinique	SABRAZES.	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	PETGES.
Anatomie	VILLEMIN.	Clin. des mal. des voies urinaires	DUVERGEY
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des maladies nerveuses et mentales	ABADIE
Hygiène	LEURET.	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Médecine légale et déontologie	LANDE	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT
Electroradiologie et clin. d'électricité médicale	RÉCHOU	Hydrologie thérapeutique et climatolcgie	CREYX
Chimie	CHEILE.	Clinique dentaire	CAVALIE.
Botanique et matière médicale	GOLSE.		
Pharmacie	DUPOUY		
Zoologie et parasitologie	MANDOUL		
Médecine expérimentale	AUBERTIN.		
Clinique ophtalmologique	TEULIERES		

LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales).
PAPIN (Chirurgie générale). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale

AGRÉGÉS EN EXERCICE

	MM.		MM
Anatomie	DUBECQ.	Chirurgie générale	CHARRIER. LOUBAT.
Anatomie	DUFOUR.	Obstétrique	RIVIERE.
Physiologie	FABRE.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX
Médecine générale	DAMADE. PIECHAUD. DELMAS-MARSALET. DE GRAILLY FONTAN	Oto-Rhino-Laryngologie	DESPONS
		Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
		Physique médicale	WANGERMEZ
		Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	VITTE.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Physiologie	FABRE	Ophtalmologie	CABANNES (en congé
Médecine opératoire	PAPIN	Puériculture	FAUGERE
Accouchements	PERY.	Pharmacie chimique	VITTE
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes ..... MM. N

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

ERRATA

p. 74, A. Division de l'amibe N. n.

Le noyau N se divise..... et formation de deux amibes

Lire : une amibe n
une amibe n. n.

ou lieu de : une amibe N.
une amibe N n.

p. 76, *lire* :

a) Division de l'amibe n. n.

au lieu de : *a*) division de l'amibe N n.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MA MERE — A MON PERE

À MA SŒUR — A MON BEAU-FRERE

A TOUS LES MIENS

A Madame et Monsieur TAPIO

Aux Docteurs Maurice ROUX, Bernard GENIAUX,

Henri HECAEN

Au Docteur LE BOURGO

MÉDECIN PRINCIPAL DE LA MARINE
PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE SANTÉ NAVALE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Au Docteur ANDRE

MÉDECIN DE 1re CLASSE DE LA MARINE
PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE SANTÉ NAVALE

Au Docteur L. PLAZY

MÉDECIN-CHEF DE 1re CLASSE DE LA MARINE
PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE A L'ÉCOLE D'APPLICATION
DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE
MEMBRE CORRESPONDANT DE LA SOCIÉTÉ MÉDICALE DES HÔPITAUX
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Qui fut notre premier maître de clinique médicale. En le remerciant de ses enseignements et de la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Au médecin général CAZAMIAN

DIRECTEUR DE L'ÉCOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTÉ
DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A MES MAITRES DE LA FACULTE
ET DES HOPITAUX

A Monsieur CLIFFORD DOBELL. F. R. S.

PROTOZOOLOGIST TO THE NATIONAL INSTITUTE
OF MEDICAL RESEARCH
LATE FELLOW OF TRINITY COLLEGE (CAMBRIDGE)
ASSISTANT PROFESSOR OF PROTISTOLOGY AND CYTOLOGY
IN THE DEPARTMENT OF BIOLOGY
IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, LONDON

En le remerciant de ses conseils et de l'aide qu'il a apportée à l'élaboration de ce travail.

En témoignage de notre respectueuse et profonde admiration pour son œuvre.

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

LE PROFESSEUR H. BONNIN

PROFESSEUR DE MÉDECINE COLONIALE ET DE CLINIQUE
DES MALADIES EXOTIQUES A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE BORDEAUX
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

En remerciements respectueux de la confiance qu'il nous témoigna en nous nommant préparateur, de ses conseils et de l'honneur qu'il nous fait en présidant notre thèse.

AVANT-PROPOS

Nous tenons, au début de ce travail à exprimer, à nouveau notre gratitude à M. Dobell qui nous permit non seulement d'utiliser ses travaux mais ne cessa de nous prodiguer ses conseils, ses encouragements et même de nous tenir au courant du progrès quotidien de ses recherches.

Nous tenons à remercier aussi M. le Professeur G. Dubreuil, directeur de l'Institut Pasteur ; il mit à notre disposition un matériel abondant (milieux de culture, sérum de cheval) grâce auquel nous avons entretenu facilement nos souches d'*E. histolytica*.

Nous tenons enfin à remercier nos camarades du Laboratoire de Médecine Coloniale de l'aide qu'ils nous ont apportée et de leur collaboration.

INTRODUCTION

Depuis 1924, date à laquelle Boeck et Drbohlav découvrirent les méthodes et les techniques permettant de cultiver facilement l'*E. histolytica* de nombreux travaux, confirmant ls premiers résultats apportant des simplifications aux techniques du début, ou étudiant *E. histolytica,* sa morphologie, son cycle de vie, etc., ont été publiés.

Le but de ce travail a été, après avoir rappelé les techniques de la culture de l'*E. histolytica* d'exposer les notions nouvelles les plus importantes apportées à la connaissance de l'amibe dysentérique, et les résultats obtenus dans le domaine du diagnostic de l'amibiase, par la méthode des cultures en apportant l'observation personnelle de quelques cas étudiés au Laboratoire de Médecine Coloniale de Borreaux et à la clinique des Maladies Exotiques de la Faculté de Médecine.

Nous n'avons pas exposé les travaux faits sur l'action des médicaments (de l'émetine en particulier) sur l'amibe en cultures, ainsi que la technique de la « culture pure ».

Ces questions appellent d'autres recherches avant de pouvoir être exposées d'une manière complète et de façon utile.

HISTORIQUE

C'est en 1924, au 20e Congrès de la Société américaine de Médecine tropicale, que le docteur W. C. Bœck et le docteur J. J. Drbohlav, un Américain et un Tchèque, travaillant à l'Ecole de Médecine de Harvard, dans une note intitulée : « La culture d'une amibe pathogène (*Entamœba histolytica*) à partir d'un cas de dysenterie amibienne », apportèrent, pour la première fois d'une façon certaine, la solution au problème de la culture d'*Entamœba histolytica*.

De nombreux auteurs avaient essayé de cultiver, soit des amibes libres, soit *Entamœba histolytica,* par des procédés de culture qu'il est intéressant de rapporter, ces auteurs ayant eu à résoudre, dès les premières recherches, des problèmes qui se retrouvent dans les techniques modernes comme la présence de bactéries dans les cultures et la nécessité d'empêcher leur trop grande abondance, et aussi parce qu'à travers l'historique des cultures on peut suivre l'histoire d'*Entamœba histolytica,* de sa découverte, de sa morphologie et de son rôle pathogène.

On pourrait, d'après certains, faire remonter à Auerback, en 1856, les premiers essais de culture des amibes. Quinze ans plus tard, Cunningham, après avoir découvert les amibes intestinales de l'homme avec Lewis, essaiera des cultures sur milieux artificiels. Mais il faut arriver aux travaux de Kartulis, datés de 1891, pour obtenir les premiers renseignements précis sur la question.

Kartulis, quelques temps après sa découverte des abcès du foie dus aux amibes, annonçait qu'il venait de cultiver

l'amibe dysentérique en utilisant comme milieu les infusions de paille stérilisées exposées à l'air, les amibes de cultures donnant aux chats inoculés une dysenterie typique.

Un an après, Kovacs, à son tour, tentera vainement de cultiver une amibe dont la description et celle des lésions qu'elle donne se rapportent à *Entamœba histolytica.*

Les assertions de Kartulis furent controuvées en 1894 par Casagrandi et Barbagallo, Celli et Fiocca, qui montrèrent que les amibes cultivées par Kartulis étaient des amibes libres et la dysenterie typique causée au chat une diarrhée banale.

Celli et Fiocca essayèrent à leur tour des cultures en se servant d'un milieu fait d'une gelée de fucus additionnée d'une petite quantité de bouillon et fortement alcalinisée ; leurs recherches furent infructueuses; ils ne purent arriver à séparer les amibes des microbes qui les accompagnaient.

Quelques auteurs vont alors cultiver des amibes libres.

Beyerinck cultivera une amibe « A. nitrophila » sur une gélose lavée additionnée de solution salée, puis « A. zymophila » en présence d'une seule espèce microbienne de malt gélatiné.

Ce seront les premiers essais de « culture pure mixte » où l'amibe se développera en présence d'une seule espèce microbienne.

Frosch essaiera, en 1897, de cultiver les amibes de la terre — il cultive une seule espèce amibienne en présence de bactéries, obtient la formation de kystes dans ses cultures, fait agir de la soude caustique à 20 % pendant trois jours à la température du laboratoire, détruit les bactéries sans détruire les kystes qui, ensemencés en présence de microbes asporogènes vivants, donneraient des amibes à forme végétative, les kystes ne se développant pas en présence de ces mêmes bactéries tuées.

Tsusitami, en 1898, soutient, au contraire, que l'on pourrait obtenir des développements de kystes en présence de

corps microbiens tués ; mais Zaubitzer, reprenant les travaux de Frosch, montre, à son tour, la nécessité d'offrir aux amibes de cultures des microbes vivants hors les autres aliments, les microbes tués par la chaleur étant eux-mêmes impuissants à assurer le développement des cultures.

Cette question, que nous retrouverons dans les travaux modernes, semble donc bien avoir été aperçue dès cette époque.

Mouton, en 1902, cultive une amibe de la terre de jardin en se servant d'une gélose séchée, lavée, stérilisée à 120°, et observe, dans les boîtes de Petri contenant ce milieu, le développement d'une amibe qu'il rapprochera de celle isolée par Frosch et dont il essaiera d'obtenir une « culture pure mixte » en présence, soit de Bacterium Coli, soit de vibrion-cholérique.

Mais le premier essai pour cultiver des amibes à partir de selles de dysentériques sont faits à Manille, en 1904, par Musgrave et Clegg, sur un milieu composé de :

Eau	1.000
Gélose	20
Chlorure de sodium	0,30
Extrait de bœuf	0,30

alcalinisé à 1/100.

Ils ensemencent des microbes, puis des glaires, et cultivent une amibe qui se montre pathogène pour le singe, très peu pour l'homme et pour le chat. La description de l'amibe isolée, ses caractères pathogènes, permettraient déjà d'affirmer que ces deux auteurs ont cultivé une amibe libre si des travaux ultérieurs, faits aux îles Philippines par Walker, ne venaient pas affirmer que les amibes cultivées par Musgrave et Clegg étaient bien des amibes banales.

Vers la même époque, Lesage, voulant vérifier les assertions de Schaudinn — possibilité de différencier au point de vue morphologique l'*Entamœba Coli* de l'amibe agent causal de la dysenterie amibienne, d'en faire une espèce distincte *Entamœba histolytica* et de lui attribuer à elle seule ces caractères pathogènes, — cultive des amibes des fèces des malades atteints de dysenterie tropicale pour en faire une étude expérimentale.

Lesage ensemence du mucus riche en amibes dans des boîtes de Pétri ou dans des tubes contenant de la gélose lavée et mis à l'étuve à 18°, 25°, cultures qui se conserveraient quatre à cinq mois.

Les amibes poussent au milieu d'une flore microbienne abondante : l'auteur essaie d'obtenir une culture pure mixte, puis de laisser enkyster les amibes et de cultiver les kystes ainsi obtenus — et ceci sans résultat.

Nous voyons là un essai de ce qui sera obtenu facilement en 1925 : la culture à partir des kystes.

Ni la description de l'endoplasme, ni sa séparation nette de l'ectoplasme, ainsi que les autres caractères donnés par Lesage, ne permettent de faire de l'amibe cultivée *Entamœba histolytica* Schaudinn.

Au point de vue expérimental, il obtient, chez le chat, une diarrhée avec présence de parasites dans les selles et lésions du gros intestin. Le parasite paraît même passer dans le sang : et l'obtention de l'amibiase expérimentale paraît être obtenue par ingestion ou inoculation sous-cutanée de kystes.

Dobell dira, en 1919, dans son livre *The Amœbae living in man* que les amibes que Lesage cultiva à partir des selles dysentériques et avec lesquelles il effectua, sur le chat, des expériences auxquelles on ne peut ajouter aucun crédit, étaient des amibes libres.

Walker, en 1908, étudie un certain nombre d'amibes de l'homme et d'animaux. Les cultures sont faites sur milieux solides (gélose au gélatine) : en étudiant l'acidité, les ami-

bes paraissent sensibles à ce facteur. Il obtiendra des cultures pures mixtes, mais échouera dans ses essais de culture pure.

Il décrira un cycle d'évolution comprenant une multiplication par division binaire, la formation de kystes et la formation de jeunes amibes par l'intermédiaire de spores.

Puis, étudiant les espèces amibiennes que l'on considère comme pathogènes, il se demandera si *Entamœba histolytica* Schaudinn est bien l'agent causal de la dysenterie.

Déjà, des auteurs de cette époque commençaient à douter de la possibilité de cultiver l'amibe *Entamœba histolytica.*

Werner arrive aisément à cultiver une amibe libre (A. limax) qu'il identifie avec celle isolée par Musgrave et Clegg, mais ne peut, sur les milieux habituellement employés, cultiver l'amibe pathogène.

Liston et Martin, avec une souche isolée par Musgrave et Clegg, ne purent jamais infecter le chat ; et Vagler, en 1909, émet l'hypothèse que les cultures d'amibes proviennent de kystes saprophytes des milieux ambiants ingérés avec les aliments. Les amibes cultivés seraient donc des amibes libres ayant traversé le tube digestif sans s'y multiplier, mais capables de se retrouver dans les selles — cette opinion allait être reprise quelques années plus tard.

Noc essaie à son tour, en 1909, en Cochinchine, de cultiver des amibes pour étudier les rapports épidémiologiques existant entre la recrudescence de la maladie et l'arrivée de la saison des pluies : il cultivera des amibes des selles dysentériques, d'abcès du foie et des eaux de la ville de Saïgon.

Il peut isoler de la paroi d'un abcès du foie une amibe qui, cultivée sur gélose de Mouton alcalinisée, présente un endoplasme brillant et un ectoplasme vacuolaire où le noyau n'est pas très visible; apparent, ce noyau est arrondi, excentrique, pourvu d'un gros karyosome sphérique ; ces

amibes donneraient des kystes ovalaires après trente-six heures de culture.

Dans les selles dysentériques, il isole par culture une amibe de 3 à 60 μ de dimension ; certaines d'entre elles renferment de nombreux globules rouges pourvus d'un noyau excentrique clair à gros karyosome.

Enfin, dans les eaux de Saïgon, il isolera une amibe identique aux précédentes.

Dobell jugeant les travaux de Noc, dira que « ces amibes se rapprochaient d'*Entamœba histolytica*, surtout les amibes isolées à partie des selles, mais que les amibes cultivées étaient certainement des amibes libres — et non *Entamœba histolytica* — étant donné surtout le résultat certainement négatif des inoculations au chat ».

En 1911, Von Wasielewski et Hirschfeld cultivent facilement des amibes libres à 22°, 24°, et Wells, à la même époque, après avoir obtenu des cultures d'amibes du genre limax en exposant simplement à l'air des boîtes de Pétri contenant les milieux employés à ce moment-là, et facilement des cultures à partir de selles dysentériques ou d'abcès du foie par les méthodes de Musgrave et Clegg, montre que les techniques employées sont mauvaises, les contaminations aériennes trop faciles pour que l'on puisse affirmer la réussite d'*Entamœba histolytica*.

En 1911 aussi, Walker, reprenant ses travaux de 1908, cultive sur gélose de Musgrave et Clegg des amibes des eaux de Manille et obtient des A. limax ; des amibes des selles de dysentériques et obtient des amibes *Amœba Ehrenberg*, alors que les amibes examinées dans les selles appartiennent au genre *Entamœba Casagrandi*.

Ne pouvant supposer qu'en culture il y ait de tels changements morphologiques, Walker conclut qu'il n'a pas cultivé l'amibe parasite — pas plus que ses prédécesseurs Musgrave et Clegg, Gauducheu, Noc, etc... — mais des amibes commensales non pathogènes.

C'est à des conclusions semblables qu'allaient arriver Chatton et Lelung-Bonnaire dans un article critique des travaux antérieurs dont les auteurs n'avaient jamais soupçonné que les amibes de culture puissent être différents des amibes de selles — et ceci malgré des différences de pouvoir pathogène, des différences de structure du noyau — alors que la morphologie des amibes libres en culture n'était pas changée

Chatton et Lelung-Bonnaire reprenaient l'hypothèse de Vagler : des kystes d'amibes libres ingérés par l'homme traversant sans danger le tube digestif et poussant sur les milieux de culture alors qu'*Entamœba histolytica* était détruite.

Gauducheau en 1912 reprend les essais de 1908 durant lesquels il avait cultivé à partir d'un cas de dysenterie amibienne, sur gélose ordinaire, sur pomme de terre, en présence de *B. typhosus* et autres microbes, une amibe qu'il appellera *E. phagocytoïde,* qui ingère des globules rouges et se multiplie par division binaire. Il cultive à nouveau en 1912 sur ces mêmes milieux des amibes qui donneraient au chien, une heure après l'injection intra-veineuse de culture, une dysenterie typique ; l'auteur, malgré ce résultat expérimental, n'ose conclure au rôle pathogène de ce parasite.

William et Calkins cultivent pendant plusieurs années une amibe isolée par Craig et trouvent que les caractères morphologiques d'une amibe peuvent varier au point de pouvoir placer les amibes, selon le moment de l'observation, dans une espèce ou dans une autre.

Ceci serait dû d'après eux aux conditions de culture, mais pourrait se passer aussi dans l'intestin humain.

Walker, cité plus haut, donnait à ses travaux une conclusion différente que les recherches ultérieures devaient confirmer.

On était arrivé à cette époque là à une connaissance pré-

cise au point de vue morphologique d'*E. histolytica*. Walker avait montré en 1911 qu'*E. histolytica* et *E. Coli* étaient des espèces distinctes facilement différenciables : l'une donnant des kystes à quatre noyaux, l'autre à huit noyaux, et que la reproduction se faisait par la division répétée d'un seul noyau et non par « autogamie » selon le processus décrit par Schaudinn; mais les résultats contradictoires des cultures, les essais infructueux d'inoculation aux animaux rendaient douteux le rôle pathogène d'*E. histolytica*.

Walker et Sellards allaient le confirmer par des expériences décisives en infectant des individus par ingestion de kystes d'*E. histolytica*. Vingt individus furent infectés et présentèrent des dysenteries typiques : on retrouva *E. histolytica* dans leurs selles mais il ne fut possible sur aucun de ces vingt cas d'obtenir une culture de cette amibe.

Walker et Sellards mettaient fin à une première période de recherches qui se soldait par un insuccès complet. Les résultats de la culture de l'amibe n'ayant servi qu'à entretenir des erreurs de description morphologique et à retarder le moment auquel le rôle d'*E. histolytica* pourrait être précisé.

Les recherches recommencèrent peu après et la même année Couret et Walker James essayaient de cultiver *E. histolytica* en culture pure sur des tissus autolyzés. Des morceaux stériles de foie, de rein, de cerveau de lapin, cobayes ou chats, de placenta humain, sont mis dans un flacon stérile scellé et conservé à une température de 40° pendant dix à vingt jours; au bout de ce temps, l'autolyze étant suffisante, un peu de ce tissu est mis dans un tube de gélose inclinée. Le liquide est absorbé par la gélose et sur ce milieu les auteurs cultivent une amibe isolée d'un abcès du foie, cinq espèces d'amibes isolées de l'intestin dans un cas de dysenterie franche et une amibe isolée par Musgrave et Clegg.

Le manque de description des amibes cultivées, le manque d'étude du pouvoir pathogène et ce que nous ont appris les expériences précédentes nous obligent à un grand scepticisme quant à ces résultats de culture de l'*E. histolytica.*

En 1916, Penfold, Woodcock et Drew essayèrent de cultiver des kystes pour observer le dékystement et inoculer au chat les formes végétatives obtenues.

Les auteurs prirent une certaine quantité de matières fécales contenant de nombreux kystes qu'ils émulsionnèrent dans de l'eau salée, filtrèrent sur gaze pour éliminer les gros débris de matières fécales, centrifugèrent le filtrat, lavèrent le culot à plusieurs reprises, centrifugèrent à nouveau pour obtenir un dernier culot riche en kystes.

Ils employèrent de la pepsine en milieu acide et des extraits pancréatiques pour favoriser, d'après eux, le dékystement. Ce fut le milieu suivant qui donna les meilleurs résultats :

Bouillon nutritif ..... 5 parties
Liquide pancréatique de Benyers..... 2 à 3 parties
Sédiment de mat. fécale avec kystes 1 partie
les tubes sont mis à l'étuve à 37° pendant cinq heures.

Les auteurs observent le dékystement au bout de cinq à six heures. Nous donnerons des détails lorsque nous traiterons cette question. Ils firent des repiquages de ces premières cultures dans le liquide de condensation de tubes de gelose ou sang, auquel on avait ajouté deux parties de sang citraté ou des parties égales de sang citraté et de sérum. Ces nouveaux tubes furent mis à l'étuve à 37° de dix-huit à vingt heures ; les auteurs virent de petites amibes, certaines contenant des globules rouges, mais l'abondance des bactéries fut telle en quelques jours qu'elle entrava rapidement le développement des amibes qui disparurent quarante-huit heures après.

Dobell, un peu plus tard, reprendra ces expériences avec A.-C. Stevenson, mais ne pourra obtenir aucun développement des kystes.

Ce travail était néanmoins intéressant car on voyait utiliser pour la première fois une méthode d'enrichissement des selles, une température de 37° et des milieux contenant des liquides albumineux, du sérum au sang citraté, toutes choses que les futures techniques allaient employer.

En 1918 paraissait un travail de Cutler qui, pour certains auteurs serait le premier à avoir cultivé *E. histolytica.*

Cutler annonçait qu'il lui avait été possible d'obtenir des cultures d'*E. histolytica* gardant leur vitalité pendant de nombreux mois et causant au chat des lésions de dysenterie typique.

Sur quarante-cinq échantillons de fèces, six donnent des résultats. On emploie comme milieu le milieu de Musgrave et Clegg, la gélose ordinaire; mais aussi des milieux courants en bactériologie :

1° *Le milieu à l'œuf de Dean et Monat, modifié :*

Un œuf entier est fortement agité dans un flacon avec des billes de verre, on ajoute 300 cm. cubes d'eau distillée et on agite à nouveau, le mélange est porté à 100° au bain-marie pendant une demi-heure et constamment agité — on répartit en tubes et on stérilise à l'autoclave.

On ajoute quelques gouttes de sang avant l'emploi.

2° *Le milieu au sang :*

500 cm. cubes de sang humain coagulé sont mis à bouillir pendant une heure dans un litre d'eau.

On ajoute au filtrat 5 % de chlorure de sodium et 1 % de peptone.

Le milieu est réparti en tubes, stérilisé durant vingt minutes pendant trois jours.

Quelques gouttes de sang sont ajoutées avant l'emploi.

On se sert de mucus sanguinolent pour ensemencer les tubes ; on ajoute alors quelques gouttes de sang frais.

Les tubes furent mis à l'étude à 37°, puis on constata que des températures de 27 à 28° suffisaient tout en possédant l'avantage supplémentaire d'entraver le développement des bactéries qui tuent rapidement les amibes en cultures.

Au bout de vingt-quatre heures, les auteurs constatèrent une extraordinaire abondance d'amibes dans leurs tubes, mais ils furent amenés à les repiquer chaque jour dans des milieux neufs mis auparavant à l'étuve à 37°, les variations d'acidité du milieu arrêtant le développement des amibes.

Les amibes de culture se présentent sous la forme de masse de 15 à 18 μ de diamètre, à cytoplasme homogène, contenant des globules rouges, émettant des pseudopodes rapides et se déplaçant activement quand examinés sur la platine chauffante du microscope.

Le noyau est du type normal, l'existence d'amibes binucléées étant fréquente.

Cutler observa dans ses cultures des enkystements spontanés — pour obtenir des kystes dans les autres cultures, il arrêta le repiquage pendant deux ou trois jours et plaça le matériel dans la glacière — de nombreux kystes se formèrent. Ces kystes inoculés à des chats leur donnèrent une dysenterie rapidement mortelle avec des lésions nettes.

Les amibes furent retrouvées dans les selles des chats sous forme d'amibes végétatives à large cytoplasme.

Ce travail, par l'apparente simplicité de la technique et la netteté des résultats obtenus suscita d'autres recherches tendant à la confirmer.

Dès 1919, Dobell *et* S.-R. Douglas, suivant point par point ces techniques, n'arrivèrent pas à cultiver des amibes

pathogènes et mirent en doute les conclusions de Cutler.

Dobell et Laidlaw reprirent le milieu de Cutler en 1925 pour conserver une souche d'*E. histolytica* aisément obtenue sur le milieu de Boeck-Drbohlav et virent les amibes péricliter rapidement et, au bout de deux jours, aucune amibe vivante ne fut retrouvée.

Le milieu de Cutler peut donc servir comme un milieu de conservation pendant un temps très court, mais paraît impropre à l'entretien régulier des cultures.

Cutler doit être considéré comme un précurseur, mais non comme ayant résolu le problème.

La même année, un Japonais, K. Yoshida, avec un milieu liquide fait de :

liquide de Ringer, 4 parties
sérum de cheval, 1 partie

observe le dékystement en 72 heures, à 22, 27°.

Sur un milieu fait de :

gélose à 2 %, 2 parties
sang de cheval, 1 partie

et à la température de 30°, il déclarera observer le cycle de vie complet d'*E. histolytica* en ensemençant de l'eau de condensation du milieu une petite quantité de kystes obtenus par une méthode d'enrichissement basée sur la différence de densité des kystes, dont nous parlerons plus loin. Mais les résultats nous semblent bien erronés, Yoshida parlant de changements morphologiques d'*E. histolytica* en cultures.

En 1919, Dobell pouvait dire avec raison dans son livre : *The Amœbae living in man :*

« Il y a peu de chercheurs qui croient actuellement qu'*E. histolytica* soit cultivable par les méthodes connues ».

En 1924 on allait cultiver pour la première fois, tout d'abord des *Entamœba* d'une tortue *Chelydra serpentina* et quelques temps après *E. histolytica.*

Ce furent Barret et N. Smith qui cultivèrent une amibe de la tortue en se servant d'un milieu liquide de Barrett pour la culture des blastocytis :

sérum humain : 1 partie
eau salée 5/1.000 : 9 parties
réparti en tubes (5 cm. cubes) et ph = 8.

Le mucus intestinal est déposé au fond du tube et le tube mis à la glacière (10°) ou à la température du laboratoire.

Les souches se sont ainsi conservées plusieurs mois avec des repiquages réguliers.

Taliaferro, Holmes et Dobell confirmèrent les résultats.

Un mois après la publication du travail de Barrett et N. Smith, paraissait la note de Boeck et Drbohlav annonçant qu'ils avaient cultivé *E. histolytica.*

C'est en essayant de cultiver des flagellés intestinaux sur milieu de Boeck que les deux chercheurs virent pousser des amibes au fond de leurs tubes. Ils énoncèrent bientôt les principes généraux de leur technique :

1° emploi d'un milieu mi-solide, mi-liquide, stérilisé avec un pH de départ de 7,2 à 7,8;

2° chauffage du tube de culture à 37° avant l'ensemencement ;

3° ensemencer avec des fèces contenant des formes actives d'*E. histolytica* et déposer avec une pipette au fond du tube, à la séparation du liquide et du solide;

4° repiquer tous les deux ou trois jours, les amibes disparaissant au bout de cinq à six jours.

Cette méthode de culture dont nous parlerons plus en détail au chapitre des techniques permet aussi la culture d'autres amibes et de flagellés (trichomonas, chilomastix). Elle est donc d'un intérêt général en parasitologie.

Avec cette méthode, Boeck et Drbohlav isolaient et cultivaient deux souches d'*E. histolytica* qui, inoculées aux chats, leur donnaient une dysenterie typique avec des ami-

bes identiques dans les selles, facilement cultivables et pathogènes à nouveau pour le chat.

Le docteur Drbohlav devait donner des démonstrations de sa méthode et la confirmer à Londres, puis à Paris, en isolant des souches d'*E. histolytica* qui furent le point de départ de nombreux travaux.

Pour la première fois, une technique simple permettait de cultiver *E. histolytica.*

Ces techniques furent vérifiées dès 1924 par de nombreux auteurs tels que Dobell et Laidlaw; ce dernier constata en décembre 1924 le rôle favorisant de l'amidon sur la croissance et la longévité des cultures, et vit que cet aliment figuré avait la propriété de faire enkyster les amibes de culture. Les auteurs anglais depuis cette époque continuèrent leurs recherches qu'ils consignèrent dans des publications importantes dont nous reparlerons.

Au cours de l'année 1925, de nombreux auteurs publient à leur tour les succès obtenus en cultivant *E. histolytica* selon la méthode de Boeck-Drbohlav, ce sont Guérin et Pons, Gupta, Thomson et Robertson.

En 1926, de nouveaux milieux basés sur les principes de ceux de Boeck-Drbohlav sont mis au point (milieu de Kofoïd et Wagener, milieu de Craig).

Brumpt signale aussi l'action favorisante de l'amidon de riz. Une publication de John, Yorke et Adams, précédant de peu celle de Dobell annonce la possibilité de cultiver *E. histolytica* à partir des kystes ; Yorke et Adams donnent une méthode d'enrichissement des selles permettant d'obtenir de nombreux kystes vivants.

La même année paraît un travail de Dobell et Laidlaw qui est la mise au point de tous les travaux faits jusqu'à ce moment-là. Les deux auteurs signalent l'action de l'acriflavine sur la flore microbienne des cultures ; ils donnent une explication détaillée de l'action de l'amidon et leurs méthodes de culture des kystes amibiens comprenant un temps de lavage du culot à l'acide chlorhydrique; mais ils

font surtout connaître la formule d'un milieu excellent se composant de sérum de cheval coagulé, recouvert de *Ringer* additionné de blanc d'œuf et d'amidon.

En 1927, Dobell publie de nouveaux résultats sur la culture des kystes ; en 1928, il publie son travail sur la morphologie et le cycle de vie de l'amibe en cultures, travail que nous étudions en détail au chapitre consacré à ce sujet.

R. Deschiens donne aussi la formule d'un milieu ayant comme partie liquide de l'eau physiologique et de l'albumine et précise l'évolution du pH des cultures.

Vogel étudie l'action des médicaments, du yatxen en particulier, tandis que Dobell, Laidlaw et Bishop étudient surtout l'action de l'émetine sur des amibes cultivées en milieux liquides.

En 1929, Deschiens reprend l'étude du pH et montre l'évolution chimique des milieux de cultures, et de la flore microbienne.

Craig publie à ce moment-là les premières statistiques de ses essais de diagnostic de l'amibiase par la déviation du complément en se servant d'extraits alcooliques d'amibes de culture, comme antigène.

En 1930, T. s. Simic, étudiant l'action du froid sur les amibes (*E. histolytica*) des selles ou des cultures montre que les formes végétatives résistent au froid et ne sont pas détruites immédiatement par des variations de température. Depuis lors, les travaux les plus importants sont ceux de Dobell sur l'infection des macaques par *E. histolytica;* les travaux de Deschiens et de ses collaborateurs, Daspect et Jonchères sur l'action favorisante de l'hémoglobine sur les cultures. Craig continue dans une série de publications à étudier sa méthode de diagnostic par la déviation du complément ; d'autres tels que Spector essaient des intradermo réactions avec des extraits d'amibes de culture.

Cette rapide énumération des principaux travaux consacrés à la culture de l'*E. histolytica* et *à ses applications*

depuis 1924 nous montre l'intérêt qu'a suscité dans le monde des protozoologistes la découverte de Boeck et Drbohlav. Des modifications, des perfectionnements sont sans cesse apportés aux milieux comme aux méthodes de cultures. Il semble que les recherches s'orientent, actuellement, vers l'étude du pouvoir pathogène des amibes de culture et surtout vers la possibilité d'obtenir des cultures pures d'*E. histolytica*. Déjà certains auteurs peuvent arriver à cultiver l'amibe dysentérique en « culture pure mixte » c'est-à-dire en présence d'un seul microbe et nous croyons savoir que ces mêmes auteurs sont sur le point d'obtenir ces « cultures pures » d'*E. histolytica* dont les premiers essais remontent à la fin du siècle dernier.

LES TECHNIQUES DE LA CULTURE DE L' « ENTAMŒBA HISTOLYTICA »

Dès que Boeck et Drbohlav eurent fait connaître leur découverte, les principes de leurs méthodes et les différents milieux employés, on reconnut que ces derniers étaient susceptibles, dans le cadre des principes posés par les deux auteurs, de nombreuses modifications et de perfectionnements qui permettraient d'atteindre les buts suivants :

1. Obtenir des cultures d'amibes dysentériques plus abondantes ;

2. Augmenter la longévité des cultures, partant en faciliter l'entretien, en évitant des repiquages trop fréquents.

D'où le grand nombre de milieux de toutes sortes que l'on imagina : milieux à l'œuf, milieux à la gélose; milieux au sérum coagulé dont nous donnerons les techniques de préparation plus loin.

On s'aperçut aussi que par l'emploi d'aliments figurés (amidon, hémoglobine, etc.) on pouvait arriver aux mêmes résultats et même obtenir, avec l'emploi de l'amidon, l'enkystement des amibes en cultures.

L'étude, ensuite, de certains phénomènes se passant dans les tubes de cultures (évolution chimique, étude du pH., composition et rôle de la flore microbienne, etc.) permit de fixer certains points de techniques, dont la connaissance précise fit diminuer certaines causes d'échecs mal expliquées jusque-là.

Après avoir exposé les principes généraux de la méthode de Boeck et Drbohlav et énuméré rapidement les milieux

qu'ils employèrent, nous donnerons la liste des milieux les plus employés à l'heure actuelle ; nous exposerons ensuite la conduite des cultures contrôlée par notre propre expérience soit à partir des formes négatives, soit à partir des kystes ; à ce sujet nous verrons l'importance pratique du pH. des cultures, du rôle des aliments figurés, de la flore microbienne, de l'action de la température situant à chaque fois les détails de techniques issus de l'étude de ces divers éléments.

1 La Méthode de Boeck-Drbohlav.

Elle consiste dans l'emploi d'un milieu de culture préparé de façon stérile et comprenant :

1° un support solide, formant plan incliné ;

2° une partie liquide recouvrant tout ou partie du support solide ;

3° l'ensemencement de ce tube de culture chauffé à 37°, se faisant au fond du tube, à la limite de séparation du solide et du liquide ;

4° Le repiquage sur milieux neufs tous les deux jours.

Le premier milieu utilisé par les auteurs était le milieu de Dorset à l'œuf coagulé, avec comme partie liquide un mélange de :

Sérum inactivé (homme, cheval) ..... 1 partie
Liquide de Ringer ..... 8 parties

ils employèrent successivement les milieux suivants :

Sérum de cheval et solution salée ;
Bouillon au sang de Cutler ;
Gélose-sang et solution salée ;
Gélose-sang, solution de Locke et sérum humain ;
Œuf coagulé et solution salée ;
Œuf coagulé, solution salée et sérum de cheval ;

Solution de Locke, œuf coagulé, sérum de cheval ;

Solution de Locke, œuf coagulé et sérum humain (L. E. S.) ; en anglais Locke, Eqq, Serum (L. E. S.) ;

Le même milieu et extrait aqueux de fèces ;

Solution de Locke et gélose semi-solide, sérum humain et de cheval ;

Solution de Locke, gélose semi-solide, sérum humain ;

Sérum de Loeffler solution de Locke et sérum de cheval ;

Solution de Locke, œuf coagulé et albumine d'œuf cristallisé à 1 % (L. E. A.).

Mais rapidement les auteurs n'emploient plus que trois sortes de milieux :

Milieux à l'œuf (Dorset, L. E. S. ; L. E. A.) ;

Milieux au sang (gélose au sang chauffé) ;

Milieux à la gélose

en même temps qu'ils suppriment la filtration de la partie liquide sur bougie Berkefeld. Les résultats furent aussi satisfaisants que possible ; ces milieux sont toujours employés avec succès ainsi que ceux dont nous allons parler maintenant.

Les milieux de cultures

Désormais classiques, ces principes généraux et les principaux milieux employés et la manière de les préparer figurent dans les traités de microbiologie et de protozoologie tant en France qu'à l'étranger,

Traité de Microbiologie de Calmette, Nègre, Boquet.
Traité de Microscopie de M. Langeron.
Protozoology of Thomson and Robertson.

Nous emprunterons à M. Langeron sa classification et la méthode de préparation des milieux qu'il donne dans son *Traité de microscopie* (1934, 5e édition, p. 674).

Nous ajouterons les formules de quelques milieux liqui-

des qui ne permettent pas une culture régulière des amibes dysentériques, mais peuvent servir à les conserver pendant quelque temps.

A. *Les milieux à l'œuf.*

I. Milieux a l'œuf coagulé.

Milieu de Dorset.

1° Verser dans un flacon à large goulot, contenant des billes de verres, le contenu total de 3 œufs auquel on ajoute 30 cm³ de Liquide de Ringer.

Les flacons et billes de verre seront stérilisés, la coquille des œufs lavée à l'alcool, les mains de l'opérateur lavées et passées dans un liquide antiseptique : Flamber le pôle de l'œuf opposé à la chambre à air ; percer ce pôle avec un outil flambé et le poser sur le goulot du flacon. Percer le pôle de la chambre à air et souffler pour faire couler l'œuf.

2° Emulsionner en agitant fortement.

3° Répartir en tubes stérilisés à l'avance. Employer des tubes de 120 sur 11 millimètres.

4° Chauffer les tubes à 120° pendant 1 heure dans une étuve à coaguler le sérum, toutes bulles d'air doivent disparaître et la coagulation être complète.

5° Recouvrir de liquide ovomucoïde la couche inclinée d'œuf coagulé.

Milieu de Boeck (*Locke-œuf-sérum*)

(*L. E. S. des auteurs anglo-américains.*)

Analogue au milieu de Dorset.

1° Emulsionner le contenu total de quatre œufs avec 50 cm³ de liquide de Locke dans un flacon garni de billes de verre.

2° Répartir en tubes.

3° Coaguler en une fois par chauffage à 75° dans une étuve à coaguler le sérum.

4° Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

5° Recouvrir de :

Sérum humain inactivé et stérile	1 partie
Liquide de Locke	5 parties

Si nécessaire filtrer une ou deux fois le sérum dilué dans 2 ou 3 fois son volume de liquide de Locke sur bougie Berkefeld.

Milieu de Boeck et Drbohlav. (*Lock, œuf, albumine*). *L. E. A.*

Identique au précédent mais :

5° Recouvrir de liquide ovomucoïde préposé avec du liquide de Lock.

Milieu de Kofoid *et* Wagener.

Identique au milieu de Boeck et Drbohlav, mais :

5. Recouvrir de 10 cm³ d'un mélange

Liquide de Locke	100 cm³
Sang défibriné de lapin, rat, cobaye, chat ..	0,5 cm³

Milieu de Deschiens.

1. Emulsionner 1 œuf total avec 10/100 de solution physiologique à 7/1000.

2. Coaguler à 75° pendant 1 heure en tubes inclinés, en mettant 2 cc. du milieu (œuf total+solution physiologique) dans des tubes de 10 mm. de diamètre intérieur.

3. Recouvrir avec

1 à 2 cc. d'eau physiologique albumineuse (10 % de blanc d'œuf).

Milieu de Kofoid *et* Mc Neil.

Analogue au milieu Kofoid et Wagener, mais la coagulation et la stérilisation se fait en une seule fois en chauffant à 120° pendant une 1/2 heure.

On recouvre ensuite de Liquide de Locke et sang défitiné comme dans le milieu Kofoid-Wagener.

Liquide ovomucoïde (Boeck).

Verser dans un grand ballon contenant des billes de verres et stérilisé, un blanc d'œuf, recueilli aseptiquement.

Agiter, puis incorporer par petites portions un litre de liquide de Ringer stérilisé.

Mélanger intimement.

N. B. Conserver à part le liquide ovomucoïde et ne l'introduire dans les tubes qu'au moment de l'emploi.

II. Milieux gélosés.

Ces milieux présentent, sur les milieux à l'œuf, l'avantage d'une préparation beaucoup plus facile.

Gélose salée (Drbohlav). — Cette gélose se prépare soit en employant la formule du milieu NNN (14 gr. de gélose pour un litre d'eau salée à 6 %) soit en dissolvant 14 grammes de gélose dans un litre de liquide de Ringer additionné de 0,5 % de phosphate monopotassique comme régulateur (pH 7,4). Gélose amidonnée (Drbohlav). A la formule précédente ajouter 1 % d'amidon. Gélose au sang chauffé (milieu chocolat), on peut employer la formule de Mathis ou préparer du milieu NNN avec un sang quelconque et chauffer les tubes inclinés à 100° pendant trente minutes. Le milieu doit prendre une couleur chocolat.

Après solidification en couches inclinées, ces trois milieux seront recouverts de liquide ovomucoïde.

Milieu de Tanabe et Chiba à l'asparagine (1928) 1 support solide. — Ringer solidifié par 1 % de gélose. Faire dissoudre la gélose à l'autoclave et filtrer sur flanelle. Ajouter 0,1 % d'asparagine au filtrat, répartir en tubes et stériliser.

2. Partie liquide. — Ringer additionné de 5 % de sérum de lapin. Verser assez de ce liquide pour recouvrir la gélose.

3. Aliment figuré. — Avant l'ensemencement, ajouter 2 ou 3 anses d'amidon de riz préalablement stérilisé à 160-180° (chaleur sèche) pendant une heure.

Sur ce milieu, les amibes se développent en abondance à partir du troisième ou quatrième jour. La culture peut vivre douze à quatorze jours. Son pH initial est 7,8, il tombe à 6,4 vers le quatrième jour et à 5,6 au moment où la culture meurt.

Milieu de Deschiens et Kipchidzé (1930). — Ce milieu est formé d'une gélose nutritive du type Musgrave et Clegg recouverte d'eau physiologique ou de liquide de Ringer tenant en suspension un double aliment figuré.

1. Support solide

Gélose	20 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Extrait de bœuf	2-5 gr.
Eau distillée	1000 cm³

Préparer cette gélose comme une gélose nutritive ordinaire. Répartir en tubes inclinés (5 cm³ par tube). Le pH doit être aux environs de 7.

2. Partie liquide. — Liquide de Ringer ou eau physiologique à 6 % (pH 7-7,6) (5 cm³ par tube).

3. Aliment figurés. — Ajouter à chaque tube, au moment de l'ensemencement, environ 2 centigrammes de poudre de poisson ou de muscle de bœuf et d'amidon de riz. Sur ce milieu la longévité des cultures peut atteindre dix jours ; par prudence, on peut repiquer de huit en huit jours.

Milieu de Cleveland et Collier (1930). — Ces auteurs ont employé une gélose à l'infusion de foie avec laquelle ils disent avoir obtenu presque 100 % de succès et des cultures extraordinairement riches. Malheureusement ce milieu est une préparation industrielle (Difco), comme du reste la plupart des milieux employés par ces auteurs. Il y a là une première difficulté, car il estmalaisé, en dehors des Etats-Unis, de se procurer ces produits spéciaux. En outre, les essais que nous avons effectués avec ce même produit n'ont pas été encourageants. Pourtant, d'après Cleveland et Collier, ce milieu est presque spé-

cifique pour *E. dysenteriae*; il convient aussi à *Dientamœba fragilis*, mais pas du tout à *E. Coli*, ni à *Eudolinax nana* et *Pseudolinax butschlii*.

III. Milieux au sérum coagulé.

Milieu de Dobell et Laidlaw (1926). — Ce milieu se compose de sérum de cheval coagulé en tubes inclinés, recouvert de liquide ovomucoïde concentré, préparé avec quatre blancs d'œufs pour un litre de liquide de Ringer. Grâce à cette haute teneur en albumine, les frottis adhérent mieux aux lames. L'aliment figuré est constitué par de l'amidon de riz.

Milieu de Simitch (1930). — Simitch emploie comme support solide le sérum glycosé de Loeffler coagulé, comme partie liquide le liquide de Ringer et comme aliment figuré l'amidon de riz.

La composition du sérum de Loeffler est la suivante :

1. Préparer du bouillon glycosé suivant la technique habituelle des laboratoire de bactériologie :

Eau	1000 cm³
Viande de bœuf	500 cm³
Peptone	20 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Glycose	10 gr.

alcaliniser très légèrement avec de la soude.

2. Mélanger une partie de bouillon et trois parties de sérum de cheval ou de bœuf.

3. Répartir en tubes et coaguler à 70-75°.

Lorsqu'on ne peut se procurer du sérum de cheval, R. Dhayagude a indiqué l'emploi d'un milieu gélose Ringer au liquide duquel on ajoute un fragment de gros intestin de chat, ce fragment peut être frais ou avoir été chauffé dans de l'eau pendant vingt minutes à 110°.

L'aliment figuré est de l'aliment de riz.

IV. Milieux de préparation industrielle.

Milieu de Cleveland *et* Collier (1930).

Déja décrit au chapitre des milieux à la gélose.

Milieu de J. H. St John.

Milieu au cœur de bœuf (Difco). Milieu liquide sans support solide préparé en faisant bouillir pendant une heure dans un liquide de Locke de la poudre de cœur de bœuf. L'aliment figuré est de la farine totale de blé de marque spéciale.

Milieu de Cleveland *et* Collier.

Ils emploient le sérum de Lœffler, sous forme assez de préparation industrielle (Difco). Le liquide de recouvrement est du sérum frais de cheval étendu de 6 parties de solution physiologique à 0,8 %. L'aliment figuré est de la farine de riz.

V. Milieux liquides.

On peut se servir de liquide de Ringer ou de solution physiologique pour conserver vivantes des amibes dans des selles pendant quelques heures.

On peut aussi employer les milieux de Craig.

Liquide de Locke ou de Ringer	7 parties
Sérum humain inactivé	1 partie.

Le liquide de Ringer, utilisé par Craig, a la formule suivante :

Chlorure de sodium	8 gr.
Chlorure de Calcium	0 gr. 2
Chlorure de Potassium	0 gr. 2
Eau distillée	1000 gr.

ou le milieu 2.

Eau physiologique (0,85 %)	7 parties.
Sérum humain inactivé	1 partie.

Ces milieux, semblables quant aux principes de leurs préparations, donnent tous d'excellents résultats, certains ayant l'avantage d'assurer aux cultures une longévité supérieure aux autres.

En pratique, les plus commodes sont les milieux de Boeck-Drbohlav et le milieu de Dobell au sérum de cheval coagulé.

Nous avons employé ce milieu depuis un an avec succès, il nous a permis de conserver des souches d'*E. histolytica* pendant plusieurs mois, le repiquage ayant lieu régulièrement tous les trois jours.

Avec le milieu de Deschiens-Kipchitzé, nous avons eu aussi de bons résultats ; nous l'avons employé pour éviter des repiquages trop fréquents ; mais il faut repiquer tous les six jours, le délai de 8 ou 10 jours donné par les auteurs nous semble un peu long.

LA CONDUITE DES CULTURES

On peut se servir comme matériel amibien de formes végétatives ou des formes enkystées. Nous étudierons les techniques dans les deux cas.

A. La culture des formes végétatives.

1° A partir d'un malade. — Si le malade est en épisode aigu, il suffit de prélever un peu de mucus sanglant ; un peu de matières liquides s'il a la diarrhée et ensemencer dans un tube de culture chauffé à 37°. Le prélèvement sera fait avec une pipette en verre épais à peine étirée munie d'une tétine en caoutchouc permettant d'aspirer les mucosités directement par voie transanale, ou mieux à l'aide d'une longue tige terminée en palette facilement stérilisable. La méthode du coton monté est à rejeter comme mode de prélèvement, car il y a dessication rapide des mucosités, dégénérescence rapide des amibes et échec certain des cultures.

On peut aussi provoquer une diarrhée légère chez un malade convalescent, soit par l'administration de sels biliaires selon la méthode de Lenoir et Mathieu de Fossey, soit par lavement iodé, ou mieux par l'administration d'un purgatif salin (sulfate de soude, sulfate de magnésie) à la dose de 15 grammes. La dose de 30 grammes indiquée par divers auteurs nous paraît trop forte, pouvant déclancher une colite dysentérite aiguë.

Le meilleur mode d'administration de ce purgatif est la

méthode fractionnée (5 grammes pendant 3 jours) ; il se produit ainsi une série d'irritations coliques successives susceptibles de déterminer une chasse muqueuse et amibienne plus riche.

Ensemencement. — La nécessité d'ensemencer les selles dès leur émission semble moins impérieuse depuis les travaux de Simitch sur la résistance au froid des formes végétatives d'*E. histolytica*, ainsi que nous le verrons plus loin et l'on peut assurer le transport des amibes dysentériques d'un hôpital à un laboratoire en utilisant la méthode préconisée par cet auteur.

Dilution de la selle dans un peu d'eau salée à 70 % ou de liquide de Ringer-Locke auquel on ajoute un peu d'amidon, les amibes restant vivantes 8 ou 10 heures.

L'ensemencement est fait selon la technique habituelle. Dans l'étuve à 37°, les tubes devront être tenus droits et non inclinés, de nombreux auteurs ayant eu de meilleurs résultats dans les tubes tenus droits.

Prélèvement. — Le prélèvement se fait dans les milieux avec une pipette émoussée et dont l'extrémité ne soit pas trop fine. On aspire un peu de dépôt du fond du tube ; l'examen entre lame et lamelle se fait à la chambre chaude, ou étuve de N. Foot, dont le professeur Brumpt a donné les plans dans les *Annales de Parasitologie* (1925, n° 3) d'après le modèle vu par lui aux Etats-Unis. Cette chambre chaude est indispensable dans un laboratoire ou une clinique où sont soignés des amibiens. Sa température étant réglée à 37°, est supérieure à la platine chauffante pour l'étude des amibes vivantes. Nous conseillons de luter les préparations à la paraffine pour éviter la dessication qui se produit fréquemment avec l'étuve de Foot et permettre l'étude prolongée des parasites.

Repiquage. — 1° La date du repiquage est fonction de l'évolution plus ou moins rapide du milieu (pH, phénomènes de fermentation, flore microbienne) : en général, il faut repiquer tous les deux ou trois jours avec les milieux usuels, milieu de Boeck, milieu de Dobell, certains milieux permettent de ne repiquer que tous les 10 jours (milieu de Tanabe et Chiba), d'autres tous les 8 jours (milieu de Deschiens-Kipchidzé).

Il faut au début repiquer tous les jours, même si les résultats semblent douteux, certaines cultures ne commençant à se montrer riches en amibes qu'au bout du 5e au 6e passage.

Il faut pour repiquer se servir aussi d'une pipette émoussée, avec laquelle on aspirera un peu de dépôt du fond du tube et on râclera la surface de la partie solide (Cleveland et Collier préconisent l'emploi de pipette droite, non étirée).

Le prélèvement ainsi fait, on ensemencera en milieu neuf chauffé à 37°.

Nous utilisons des pipettes en verre épais, peu étirées, à bords émoussés à la flamme reliées par un tube de caoutchouc à un embout de verre à l'aide duquel nous aspirons.

2° Deschiens a conseillé au lieu de repiquage la « décantation quotidienne ».

« Le milieu liquide usé est remplacé par de l'eau albuminée fraîche, en ayant soin de conserver, au moment de la décantation, la lame de liquide située au fond du tube dans l'angle dièdre formé par le plan du milieu solide et les parois du tube, cette zone étant particulièrement riche en amibes. »

Par cette méthode, Deschiens est arrivé à de meilleurs résultats qu'avec les repiquages quotidiens ; la longévité des milieux pouvant aller jusqu'à 10 et même 15 jours.

Nous avons essayé cette méthode plusieurs fois et nous n'avons observé que des longévités de 8 jours au maximum. Les amibes dysentériques en culture au bout d'une dizaine

de repiquages semblent être adaptées à leur nouveau genre de vie et si malgré tout, pour des causes indéterminées, certains tubes se montrent moins riches que d'autres en amibes, la culture devient plus aisée, ne nécessitant alors que des repiquages réguliers. Deschiens, s'inspirant des travaux de Simitch sur la résistance au froid des formes végétatives d'*E. histolytica*, a mis au point une méthode de culture qui consiste à soumettre les milieux ensemencés à des températures variables pour augmenter la longévité des milieux.

Il cultive une souche d'*E. histolytica* à la température de 37° pendant quelques jours, selon la méthode habituelle, puis au moment où le développement de la flore microbienne l'emporte sur le développement des amibes, il met les tubes de culture en glacière à 3°, 5°, et il adopte le rythme suivant :

A. 3 jours à 3° ; 1 jour à 37° ; 3 jours à 3° ; 1 jour à 37°, la longévité des milieux étant alors de 19 jours.

Deschiens essaya de porter au maximum la période froide et soumit les milieux à :

B. 10 jours à 3° ; 2 jours à 37° ; 10 jours à 3° ; 2 jours à 37°, la longévité fut de 11 jours.

Avec une température minimum de 18°, la longévité est de 10 jours avec des périodes froides courtes, et 8 jours avec des périodes froides longues.

Cette méthode semble donc intéressante par l'augmentation de longévité des cultures, due sans doute à un arrêt de développement de la flore microbienne à ces basses températures, la conséquence étant la persistance plus longue d'un pH favorable.

Mais, à notre avis, la méthode la plus pratique de cultures, surtout lorsqu'on veut entretenir de nombreuses souches d'amibes dysentériques, est la méthode des cultures discontinues employée par Dobell et qu'il a énoncée en 1931.

On cultive une souche quelconque selon les moyens usuels pendant une semaine ; on provoque l'enkystement

de la souche en la cultivant sur des milieux contenant de l'amidon ; on vérifie l'enkystement, puis on met en réserve ces kystes dans des tubes scellés à la lampe, et on les conserve à la glacière à la température de 10° environ (les températures pouvant varier de 8° à 12°) pendant un mois. Après un mois (28-31 jours), de séjour à la glacière, les kystes sont ensemencés dans des tubes de culture, donnent naissance à des amibes vivantes qui se multiplient, que l'on conserve le temps nécessaire sous leurs formes végétatives, puis que l'on fait enkyster de nouveau.

On réalise une économie de temps, de travail, de milieux et pour Dobell les souches traitées ainsi ne perdent aucune de leurs propriétés.

Nous avons, au Laboratoire de médecine coloniale, cultivé aisément des kystes de culture que nous a envoyés M. Dobell (souche N.R.S., 234e passage) et en vingt-quatre heures, après les avoir conservés une dizaine de jours à 10°, nous avons, sur milieu Dobell-Brumpt et sur milieu Boeck-Drbohlav, obtenu un grand nombre d'amibes qui sont allées en se multipliant et que nous continuons à cultiver actuellement.

B. A partir d'animaux infectés naturellement ou expérimentalement.

La technique est identique, et Dobell l'a suivie en tous points pour l'étude de l'*E. histolytica* du macaque.

L'infection expérimentale est réalisée soit par ingestion de formes végétatives ou de kystes d'amibes ou mieux par inoculation intra-rectales. On injecte au moyen d'une sonde de caoutchouc enfoncée profondément le contenu d'un ou plusieurs tubes de cultures, ou des mucosités et glaires sanglantes contenant des amibes ; on obture l'anus avec du collodion selon la méthode de Drbohlav pour éviter une

expulsion trop rapide des matières ainsi inoculées et favoriser, par la stase, le développement des amibes.

Le tampon de collodion est enlevé quarante-huit heures après ; les selles de l'animal surveillées jusqu'à l'apparition de mucosités caractéristiques riches en formes végétatives d'*E. histolytica*.

Ce passage sur animal est utile pour obtenir des souches « pures » d'amibes dysentériques, comme l'a fait Dobell pour étudier sa souche Kc28 au point de vue morphologique.

C. La culture des kystes.

Reconnue possible dès 1925 par Dobell et Laidlaw, Yorke et Adams, la technique en a été fixée par ces auteurs de la manière suivante :

1° Enrichissement de la selle contenant des kystes, puis lavages de ceux-ci pour les débarrasser des débris fécaux.

2° Ensemencement de ces kystes sur milieux usuels chauffés à 37°.

1. La meilleure méthode d'enrichissement et de lavages est celle mise au point par Yorke et Adams ; dérivée de celle de Kazuyoshi Yoshida (1920), elle est basée sur l'emploi de solutions de densité supérieure à celle des kystes (solution de Nizuame employée par Yoshida, solution sucrée à 20 % de Yorke et Adams, toutes deux ayant pour densité $d = 1080$, les kystes ayant pour densité $d' = 1060$).

Les différents temps sont les suivants :

1. Une masse de matières fécales gros comme une noix est broyée dans un mortier avec un peu d'eau distillée.

2. L'émulsion ainsi faite est agitée avec 500 cm³ d'eau dis-

tillée, puis versée dans un haut cylindre de verre et laissée au repos pendant 15 minutes environ. Les plus gros et les plus lourds débris fécaux ont le temps de tomber au fond du cylindre, et une légère couche d'écume de matières se forme à la surface).

3. L'écume est ôtée, et la masse de liquide soutirée avec un siphon, en laissant le dépôt au fond.

4. Le liquide décanté est placé dans un autre cylindre et laissé au repos pendant la nuit, les kystes et les autres débris de matières fécales allant au fond.

5. On soutire et on rejette le liquide surnageant.

6. On centrifuge le précipité.

7. Le culot de centrifugation est agité avec une solution de sucre à 20 % (d = 1080) et centrifugé à grande vitesse. Les débris fécaux restant sont alors précipités, les kystes surnageant dans le liquide.

8. On retire ce liquide qu'on dilue avec quatre fois son volume d'eau distillée.

9. On centrifuge à nouveau et on obtient un dernier culot riche en kystes.

10. Ce culot est lavé et centrifugé à plusieurs reprises pour le débarrasser des traces de sucre, et éliminer un grand nombre de bactéries.

Cette méthode est utile, car elle permet d'obtenir des culots riches en kystes intacts ; elle a l'inconvénient d'être longuent et de comprendre de nombreux temps demandant beaucoup d'attention et de soin.

Aussi lui préférons-nous dans la pratique journalière au laboratoire ou à l'hôpital la méthode de Bidegaray, qui est une simplification de la précédente et qui comprend les temps suivants :

1° Prélever gros comme un pois de selles dans de l'eau bouillie.

2° Laisser déposer pendant une minute.

3° Décanter le liquide surnageant dans un tube et centrifuger.

4° Rejeter le liquide surnageant, et agiter le culot avec une solution de sucre (saccharose) à 20 %.

5° Centrifuger de nouveau.

6° Recueillir le liquide surnageant dans une éprouvette et le diluer de quatre fois son volume d'eau pour abaisser la densité.

7° Centrifuger à nouveau, puis laver à plusieurs reprises pour débarrasser le culot des traces de saccharose.

8° Ensemencer.

On voit le gain de temps considérable réalisé par cette méthode, dont le résultat final est aussi bon.

Ces méthodes sont peut-être inférieures aux méthodes courantes (Telemann et ses variantes, Carles et Barthélemy) ; elles enrichissent moins que ces dernières, les kystes pouvant avoir des densités variables, mais elles ont l'avantage de ne pas les altérer.

Ujibara de même que Dobell préconisent le lavage des culots avec des solutions d'acide chlorhydrique.

Ujibara se sert de solutions à 2 % dans le but de détruire des bactéries ; Dobell emploie des solution à CPH N/20, mais ceci dans des expériences précises où il voulait détruire les formes végétatives et ne cultiver que des kystes.

Dans la pratique journalière, ces lavages nous semblent inutiles, les techniques employées débarrassant les kystes de la plupart des bactéries.

2. *L'ensemencement.* — Il se fait de la même manière que celui des formes végétatives : tubes chauffés à 37° et dépôt du culot au fond du tube à la limite du solide et du liquide.

On ensemencera de la même manière les kystes de culture obtenus en cultivant, selon les indications de Dobell, les formes végétatives sur des milieux à l'amidon.

Un des meilleurs milieux est le milieu de Dobell (sérum coagulé, liquide de Ringer, sérum) ou le milieu de Boeck et Drbohlav (œuf coagulé, liquide de Locke, sérum).

Vingt-quatre heures après, on a de nombreuses amibes vivantes que l'on pourra faire enkyster à nouveau

LE pH DES CULTURES

Tous les auteurs, MUSGRAVE, et CLEGG, WALKER, etc., avaient déjà signalé qu'il leur semblait qu'un certain taux d'alcalinité ou d'acidité était favorable au développement des amibes, et la formule de leurs milieux s'accompagnaient d'une indication quant aux réactions chimiques du milieu.

Mais les données précises du problème devait être fournies par DESCHIENS qui, par la mesure du pH des cultures, paraît nous indiquer avec précision les degrés d'acidité ou d'alcalinité optima.

Les mesures de DESCHIENS (1927) ont porté sur des milieux contenant un aliment figuré : l'amidon.

Le pH de départ du milieu liquide doit être entre 7,2 et 7,6. Il y a acidification rapide du milieu en vingt-quatre heures et le pH s'abaisse à 6,6, 6,8, quelquefois à 6,2-6,4.

Ces derniers chiffres indiquent une culture pauvre en amibes ; au-dessous de 6,2, on trouve rarement des amibes vivantes.

Donc, en pratique, choisir un pH de départ au moins égal à 7,2 et inférieur à 8, 8,4 ; vers 8 les cultures étant irrégulières et à 8,6 les cultures sont négatives.

On assiste d'ailleurs dans les cultures non repiquées à une nouvelle élévation du pH vers 6,6 à la 40e heure, à 7-7,2 le 3e jour et 7,4-7,6 le 4e jour, les amibes étant mortes dès la 48e heure.

En 1928, TANABE et CHIBA montrent qu'avec leur milieu à l'asparagine, l'évolution du pH est identique, mais plus lente.

Avec un pH de départ égal à 7,8, le pH 6,4 n'est atteint que le 4e jour.

Deschiens devait encore reprendre cette question en 1929 et en 1930 montrer de façon plus précise les deux phases distinctes de l'évolution du pH et ses raisons.

Il étudie le milieu de Dorset et le milieu de Dobell, chacun ayant du liquide ovomucoïde comme partie liquide et de l'amidon de riz comme élément figuré.

Le pH de départ est de 6 à 8,8 : et après 24 heures d'étuve, *tous les tubes ont un pH de* 6,6 *à* 6,8. Il y a eu pour Deschiens « alcanilisation ou acidification du milieu pour assurer un pH constant favorable au développement des amibes ». Les milieux les plus riches étant ceux au pH initial de 7,2-7,6, le 3e jour avec un pH de 6,4-6,6, on aura un nombre maximum d'amibes qui décroîtra le 4e et 5e jour pour arriver avec un pH de 6,8-7 à la dégénérescence complète.

On constate le 4e jour dans le milieu de Dorset, le 6e jour dans le milieu de Dobell l'apparition de cristaux d'acides aminés, ceci coïncidant avec la désintégration des albumines dans un milieu commençant à se putréfier.

Il y avait donc pour Deschiens :

« 1° Une phase de fermentation butyrique de l'amidon par le *bactérium aceti butyvici* présent dans la flore associée.

» Cette fermentation se développe du 1er au 4e ou 5e jour et correspond à un pH 6,6 favorable.

» 2° Une phase de putréfaction avec dislocation des albumines, développement d'acides aminés, puis d'ammoniaque entraînant la disparition des amibes. »

Rejoignant Dobell dans ses conclusions, Deschiens dit que l'emploi d'amidon et l'amidon soluble ne peuvent remplacer l'amidon figuré, il se produirait une trop rapide acidification du milieu.

Après 24 heures, le pH serait de 5,8 ; à 36 heures de 5,4 et les amibes complètement dégénérées.

Deschiens devait se servir de ces notions pour mettre au point en 1929 un nouveau milieu de culture où l'évolu-

tion du pH se ferait encore plus lentement. C'est sur milieu à base de gélose nutritive type Musgrave et Cleqq avec comme éléments figurés de l'amidon de riz et de la poudre de poisson ou de muscles de bœuf. Le pH de départ qui est de 7,1 tombe à 6,6 pH très favorable le 4e jour et reste à ce taux pendant 7 jours. On voit donc l'intérêt d'un tel milieu évitant les repiquages répétés nécessités par les milieux Dorset ou Dobell.

C'est d'ailleurs l'intérêt d'une telle étude d'avoir permis, en fixant l'évolution chimique d'un milieu, de préciser la date optima des repiquages pour chaque milieu, le moment de croissance maximum des amibes et faciliter l'entretien régulier des cultures.

LA FLORE MICROBIENNE DES CULTURES

Si la méthode de Boeck et Drbohlav permet de cultiver facilement *E. histolytica,* elle ne permet pas d'obtenir des « cultures pures », c'est-à-dire sans microbes, ceux-ci, comme on le voit sur des préparations fixées et colorées, étant ingérés par les amibes leur servant de nourriture.

Mais cette flore microbienne jugée indispensable peut être une cause d'échec, soit par sa composition, soit par son développement exagéré.

A. Par sa composition.

1° *Dans les milieux sans amidon.* — Dérivée du contenu intestinal, la flore microbienne contient un grand nombre de germes qui vont se développer sur les milieux de culture, et en même temps subir de profondes modifications qualitatives.

Il semble en effet qu'il y a pendant les premiers passages sur milieux artificiels une sélection naturelle des microbes qui donnera bientôt une flore adaptée à la nutrition des amibes dysentériques, flore stable qui sera un facteur de succès des cultures, à condition de ne pas en détruire l'équilibre par une faute de technique lors des repiquages.

On a essayé l'identification des bactéries composant cette flore : la tâche est ardue sinon impossible.

Dobell n'a que partiellement réussi, mais il a montré qu'il y avait nettement des bactéries favorisant la multiplication des amibes, d'autres l'entravant.

Il isole en effet trois bacilles : l'un se rapprochant du

B. dysenteriae Shiga, l'autre étant *B. lactis aerogenes,* le 3e se rapprochant du second.

Le premier favorisait la culture d'*E. histolytica* et d'*E. coli;* le second nuisait à toutes les amibes, le troisième, défavorable à *E. histolytica,* était favorable à *E. nana.*

Il essaya donc de modifier les flores bactériennes en introduisant des microbes favorables ; il n'eut qu'un résultat net : un *B. coli* facilita une culture d'*E. nana,* mais à côté de cela, beaucoup de résultats négatifs.

Pour Dobell, la flore bactérienne est avec l'amidon un facteur d'enkystement et de dékystement des amibes dysentériques en culture.

Sa souche Kc28, qu'il cultive depuis plusieurs années et qui s'enkyste régulièrement dans les milieux à l'amidon, « contient *toutes* les bactéries nécessaires et si ces bactéries sont ajoutées à d'autres souches, elles se comporteront en cultures exactement comme Kc28 ».

Ces bactéries, nécessaires, mais indéterminées, semblent spécifiques pour *E. histolytica,* car, ajoutées à des cultures d'*E. coli, E. gingivalis,* elles n'ont entraîné aucun enkystement ni dékystement.

2° *Dans les milieux contenant de l'amidon.* — Aux microbes déjà existant viennent s'ajouter les microbes nés au cours des phases de fermentation du milieu. Il y a en effet deux flores :

1° Une flore de fermentation butyrique de l'amidon.

2° Une flore de putréfaction (avec décomposition d'acides aminés).

L'étude du pH a montré qu'il y avait pendant un temps équilibre entre les deux flores, cet équilibre étant figuré par un pH 6,6 très favorable, puis lors du développement intensif de la flore de putréfaction, on voit une ascension du pH vers l'alcalinité et dégénérescence des amibes.

Cette étude du pH a permis de suppléer en partie à notre manque de connaissance de la nature précise de la flore microbienne et rendu plus facile, en déterminant ces pha-

ses favorables d'équilibre, les repiquages et l'entretien des cultures.

B. Par son développement.

Dû à des causes encore inexpliquées ou à des contaminations accidentelles, on peut voir la flore microbienne devenir luxuriante dans un tube de culture et entraîner la dégénérescence rapide des amibes.

On a essayé de lutter contre cela par l'introduction dans les milieux de cultures, au moment de l'ensemencement, de produits bactéricides ne nuisant pas aux amibes.

Ce sont les antiseptiques chimiques : acriflavine et trypaflavine qui ont donné les meilleurs résultats; il faut les employer à doses très faibles : 1 p. 20.000 et en pratique ajouter une goutte d'une solution à 1/1000 par tube de culture.

Geemar esseya l'emploi de bactériophoges, mais sans grand succès, des doses considérables de phage arrêtèrent pendant quelque temps seulement le développement d'une flore bactérienne qui s'accroît ensuite rapidement.

LES ELEMENTS FIGURES DES MILIEUX DE CULTURE

Ce sont l'amidon de riz, la poudre de poisson ou de muscle de bœuf (Deschiens), l'hémoglobine.

1° L'amidon de riz.

Au mois de mars 1926, Brumpt en signalait l'action favorisante : les amibes en culture ingéraient de la fécule ou de l'amidon de riz ; et de l'adjonction fécule, en très petite quantité, aux milieux, permettrait d'obtenir des cultures particulièrement riches.

Quelques mois plus tard, Dobell et Laidlaw signalaient à leur tour l'action de l'amidon de riz que l'un d'eux (Laidlaw) avait découvert dès le mois de décembre 1924 et utilisé depuis cette époque.

Cherchant, en effet, à fournir a *E. histolytica* en cultures des hydrates de carbone, en grande quantité, sans craindre sa décomposition rapide par les bactéries du milieu et sa transformation acide, sachant, d'autre part, que les amibes ingèrent normalement de l'amidon solide, Laidlaw pensa à offrir aux amibes en culture des hydrates de carbone sous la forme de cet aliment figuré : l'amidon de riz.

Les deux auteurs anglais virent les amibes ingérer les grains d'amidon, se multiplier rapidement, mettre de grandes quantités de glycogène en réserve dans leur protoplasme, s'enkyster facilement, et les Blastocystis, gênant les cultures, arrêtés dans leur développement.

Continuant leur étude, ils constatèrent :

1° Que tous les amidons ne convenaient pas.

Ayant essayé des amidons de blé, sagou, pois, tapioca, maïs, pomme de terre, arrow-root, ils s'aperçurent que les amidons à grains trop gros, ne pouvant pas être ingérés par les amibes, étaient inutilisables.

2° La stérilisation de l'amidon de riz devait nécessiter certaines précautions.

Ils soumirent l'amidon de riz à une température de 180° (chaleur sèche) pendant une heure, et ne virent, à cette température, aucun phénomène de désintégration signalés par quelques auteurs, mais l'amidon doit être sec, stérilisé en petite quantité dans des tubes en contenant chacun deux grammes.

3° La nécessité d'empêcher une décomposition rapide de l'amidon.

Pour éliminer les bactéries qui feraient fermenter l'aliment figuré, les deux auteurs se servirent d'une solution de trypaflavine, ou acriflavine, inoffensive pour les amibes et très nocive pour les germes de fermentation en solution à 1/20.000.

J. Sautet confirma ces vues et vit que le milieu à l'amidon de riz de Drbohlav donne de meilleurs résultats que le milieu de Dorset.

Deschiens, en étudiant le pH des milieux à l'amidon devait mettre bien en évidence les deux phases de fermentation de l'amidon et les variations vers l'acidité, puis l'alcalinité du milieu, et expliquer cet équilibre du pH au taux de 6,6, très favorable dans les milieux à l'amidon, par l'autoycnisme de ces deux flores microbiennes.

Si nous résumons l'action de cet élément des milieux de culture, nous voyons que :

Seul l'amidon de riz enrichit les cultures,

augmente la durée de conservation des amibes,

est un facteur déterminant de l'enkystement,

a une action empêchante sur le développement des Blastocystis.

2° La poudre de bœuf ou de poisson.

Deschiens, en 1929, a mis au point un milieu à base de gélose nutritive, type Musgrave et Clegg et se sert comme aliments figurés d'un mélange d'amidon de riz et de poudre de bœuf et de poisson.

Ces produits doivent être très purs et stérilisés à la chaleur sèche à 160°.

Deschiens et Kipchidze obtiendraient, avec ce milieu, un état d'équilibre du pH favorable pendant 10 jours.

3° Les hématies et l'hémoglobine.

Etant donné le caractère hématophage d'*E. histolytica*, Drbohlav, dès ses premiers essais de culture, pensa à introduire dans les tubes du sang normal ou inactivé, d'homme ou d'animaux. Se servant d'un milieu gélose (N. N. N. + liquide ovomucoïde), il utilisa des quantités variables de sang (homme, chat, lapin) chauffé à 56°, de l'hémoglobine en poudre (0,5 à 5 %) et de l'hémoglobine en solution au même taux, dissoute à froid et filtrée sur bougie Berkefeld. Il n'eut aucun résultat par rapport aux tubes témoins et, pour lui, ces substances n'étaient pas « nécessaires à la culture des amibes dysentériques ».

Kofoid et Wagener (1926) eurent même des résultats négatifs en utilisant du sang d'homme, de chat, de cobaye ou de lapin en suspension à 5 0/00 dans du liquide de Locke, les tubes témoins poussaient mieux et leur longévité était plus grande que dans les tubes aux expériences.

Il semblait alors que ces substances avaient un rôle nocif sur des cultures quand Deschiens, en 1933, reprenant la question à la lumière de ses découvertes sur les variations du pH des cultures et ses rapports avec la flore microbienne montra que l'addition d'hémoglobine et de sang figuré « entraînant un enrichissement considérable en albumines de ces milieux, enrichissement qui entraîne une

prédominance de la flore des putréfactions et une dégénérescence ou une destruction rapide des amibes ».

Les amibes ayant conservé *in vitro* — sauf quelques cas dont nous parlerons — le pouvoir de phagocyter des hématies, la question revenait à doser convenablement hémoglobine et hématies; considérant les doses employées comme trop fortes, Deschiens et ses collaborateurs Daspect et Jonchères ont employé des solutions faibles d'hémoglobine, les préférant même à des suspensions d'hématies, celles-ci par leur sédimentation déterminant, au fond du tube, une zone particulièrement riche en albumine, entraînant une putréfaction rapide du milieu, à l'endroit même de développement optimum des amibes dysentériques.

Daspect et Jonchères utilisèrent (avec des milieux Dobell-Brumpt ; Deschiens-Kipchitzé) des solutions d'hémoglobine ainsi préparées :

« 0 gr. 10 d'hémoglobine de bœuf en pailletes sont additionnées dans un ballon stérile de 5 cm³ d'éther sulfurique, agités, puis évaporés à froid afin d'en assurer la stérilisation. L'éther, complètement évaporé, on ajoute 10 cm³ de solution de Ringer : 1 cm³ de la solution contient donc 1 cg. d'hémoglobine (solution à 1 %).

» On ajoute, de cette solution, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50 gouttes à chaque tube de cultures en expérience.

» Vingt-quatre heures après, les cultures additionnées de V à XXV gouttes sont plus riches que les cultures témoins et les tubes contenant moins de V gouttes. Au delà de XXV gouttes, la culture est moins dense en amibes.

» Quarante-huit heures après, la multiplication des amibes est au maximum dans les tubes contenant de V à XX gouttes d'hémoglobine.

» Au 3e jour, les amibes commencent à dégénérer, la dégénérescence étant marquée et la flore microbienne intense dans les tubes contenant de fortes doses d'hémoglobine. »

Avec le milieu Deschiens-Kipchitzé, auquel Daspect et

Jonchères avaient ajouté de V à XV gouttes de la solution d'hémoglobine à 1/100, le développement des amibes fut plus abondant, la longévité égale à celle des tubes-témoins.

Les deux auteurs peuvent même cultiver des amibes en supprimant le sérum de cheval de la partie liquide, le remplaçant par XX gouttes de leur solution et hémoglobine.

Il semble donc que des doses de V à XV gouttes de solution d'hémoglobine à 1 % donnant, dans un tube de culture, une dilution à 1 gr. 100 d'hémoglobine, accroissent quand, ajoutés à des milieux déjà albuminés, la multiplication des *E. histolytica,* sans nuire à la vitalité et à la longévité des cultures.

Si, maintenant, on remplace les quantités optima d'hémoglobine par des volumes correspondants de sang, on voit qu'il y a impossibilité de cultiver les amibes pour les raisons indiquées plus haut (accumulation des hématies au fond du tube, orientation du pH vers une alcalinité de 0,5 à 2 0/00 en hémoglobine. Avec des solutions inférieures à ce taux les résultats sont incertains.

On comprend alors les résultats défavorables obtenus par Drbohlav, Kofoid et Wagener, qui utilisaient des concentrations de 0,5 à 5 % d'hémoglobine et des hématies en suspension à 5 0/00.

L'ACTION DU FROID SUR LES AMIBES DE CULTURES

Ses conséquences au point de vue technique des cultures

Dobell avait signalé, en 1928, qu'il avait conservé pendant trois jours, à la température du laboratoire, des formes végétatives d'*E. histolytica* en cultures sur son milieu.

Tsh. Simic devait reprendre la question en 1930 de façon beaucoup plus précise et déterminer la résistance maximum à différentes températures des formes végétatives d'*E. histolytica* soit dans les selles, soit en cultures.

Amibes des selles.

Il prend des selles fraîches qu'il dilue dans de la solution de Ringer, les met à l'étuve au laboratoire. Les formes végétatives contenues dans ces selles se conservent et multiplient dans ce milieu liquide pendant 30 heures, surtout après adjonction d'amidon de riz.

Simic prend de ces formes végétatives, les met à la glacière à 0° pendant huit heures : à l'examen direct dans l'étuve de Foot, ces amibles donnent des pseudopodes normaux et croîtront facilement sur un milieu convenable de culture.

Amibes des cultures.

Se servant de son milieu, Loffler, sérum + liquide de Ringer, Simic étudie la résistance des formes végétatives :

1° Au 1er ensemencement sur milieu artificiel ;

a) On note une résistance de 30 h. à la température du laboratoire ;

b) Une résistance de 24 heures à la température de la glace fondante.

2° Au 20 passage : résistance de 12 heures à 3°, 6° ;

3° Au 50e passage : résistance de 48 heures à la température de la glace fondante.

Simic mettait donc en évidence une capacité de résistance au froid des formes végétatives insoupçonnées jusqu'alors, résistance allant en augmentant au fur et à mesure des passages, les amibes semblant de mieux en mieux s'adapter aux conditions de vie que leur offrent les milieux de culture.

Ces faits furent vérifiés par Terrial, en 1931, et M. Langeron, en 1933. Le médecin-capitaine des Troupes coloniales, Jonchères, qui avait travaillé avec Tsh. Simic, à Skoplje, et vu ses résultats, nous avait conseillé de les retrouver sur les souches d'amibes isolées à Bordeaux, au Laboratoire de Médecine coloniale.

Nous avons étudié cette action sur une culture d'*E. histolytica* au 25e repiquage.

Deux tubes (milieu Dobell-Brumpt) furent mis à la glacière à 0° pendant 22 heures.

Après ce temps, à l'examen direct, dans l'un et l'autre tube, nous vîmes à l'étuve de Foot de nombreuses formes mobiles émettant de nombreux pseudopodes, ainsi que quelques amibes en dégénérescence.

Ces amibes repiquées en milieu neuf donnèrent deux jours après une grande quantité d'amibes vivantes. Celles-ci ayant été repiquées à leur tour, nous eûmes une nouvelle génération d'amibes, mais qui dégénérèrent rapidement et que nous ne pûmes repiquer avec succès, même en n'attendant que 24 heures pour tenter un nouvel essai de repiquage.

Tout récemment, Deschiens (en 1934) étudie de nouveau

cette question et essaie de déterminer si le temps d'action des basses températures, pouvait être encore allongé.

Deux souches d'*E. histolytica* vérifiées — l'une en cultures depuis quatre mois, l'autre depuis deux mois sur milieu Dobell-Brumpt — auquel il ajoute III gouttes de solution de trypaflavine à 1/1000 pour enrayer les pullulations microbiennes — sont soumises aux températures suivantes : 26°, 25°, 18°, 5°, 0°, 5°.

A 28°, durée de conservation des cultures : 5 jours ; au bout de ce temps-là, les amibes sont facilement repiquables.

A 25°, durée de conservation : 5 jours ; mais 50 % d'amibes en dégénérescence ; les amibes vivantes ayant de faibles mouvements de déplacement.

A la même température, un tube décanté, selon la méthode de Deschiens, aura une longévité de huit jours et, repiqué, donnera une nouvelle culture.

A 18°, (température du laboratoire), durée de conservation : 8 à 9 jours, facilement repiquable.

A 5°, durée de conservation : 11 jours. — Les amibes vivantes donnent de nouvelles cultures.

A 0°, durée de conservation : 36 à 48 heures ; amibes vivantes, mobiles et repiquables.

62 heures à 0° : amibes mortes.

— 5° (congélation) : pendant 5 à 10 minutes, prise en masse de la partie liquide ; mis à + 5° pour dégeler, on ne trouve que des amibes mortes et dégénérées.

Il ressort de cet ensemble de faits que les dires des premiers auteurs sur la sensibilité des formes végétatives d'*E. histolytica* étaient le fruit d'une expérience insuffisante ; ces nouvelles notions ont permis de modifier la technique des cultures, Deschiens vient d'étudier une méthode de culture par chauffage discontinu qui semble donner de bons résultats, d'en prolonger la longévité et faciliter les repiquages, et aussi certaines méthodes de diagnostic dont nous parlerons plus loin.

Il semble, malgré tout, que, pour obtenir des résultats constants, pour étudier certains détails de morphologie ou de biologie d'*E. histolytica,* le précepte énoncé par Dobell, en 1928 : « To obtain constant and predictable results, it is essential...

» To maintain an unvarying temperature of 37°, 38° troughout » conserve toute sa valeur.

LA MORPHOLOGIE ET LE CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE L' « E. HISTOLYCA » EN CULTURE

Dobell en 1919, dans sa monographie *The Amoebae living in man,* montrait que les techniques employées jusque là n'avaient pas permis de connaître certain détails morphologiques d'*Entamœba histolytica,* et de fixer d'une façon précise le mode de division ou de multiplication ou de dékystement de l'amibe pathogène. En effet, l'examen d'amibes fraîchement émises dans les selles sur des préparations fixées et colorées entraînait le plus souvent la description d'individus dégénérés, et celui de coupes seriées d'intestin d'animaux infectés expérimentalement permettait la seule étude de certains stades du cycle évolutif d'*Entamœba histolytica.*

Il fallait, pour arriver à cette précision, conserver *in vitro* hors de leur hôte normal *E. histolytica,* disposer ainsi d'un matériel amibien *vivant,* et l'examiner dans des conditions favorables. Aussi, dès la découverte de Boeck et Drbohlav connue de nombreux auteurs, Yorke et Adams, et surtout Dobell, reprirent-ils l'étude de ces questions de morphologie.

On avait, avant 1924, par des multiples essais de culture, essayé ce moyen pour étudier les phénomènes du dékystement, ou de la multiplication, d'*E. histolytica.*

Noc (1909), Darling (1913), Penfold, Woodcock et Drew (1916), K. Yoshida (1918-1920) avaient aussi donné des phénomènes des descriptions plus ou moins précises ou plus ou

moins complètes que nous discuterons à la lumière des travaux postérieurs à 1924.

Parmi ceux-ci c'est l'important travail de Dobell, paru en 1928, résultat de quatre années d'études, d'examens minutieux de centaines d'*E. histolytica* à l'état végétatif ou de kystes, qui nous paraît avoir apporté le plus de notions nouvelles et précisé le plus grand nombre de détails morphologiques ou biologiques de l'amibe dysentérique.

Après avoir exposé sa description de l'*Entamœba histolytica* en cultures, « cycle de vie et morphologie» et montré toutes les connaissances dont nous sommes redevables à Dobell, nous reprendrons quelques questions, telle que la division nucléaire d'*E. histolytica,* son pouvoir pathogène en cultures, qui ont fait l'objet de travaux nombreux, soit de Dobell, soit d'autres auteurs.

*La description d'*Entamœba histolytica *en cultures.* — Cette description est la traduction la plus fidèle possible du travail de M. Dobell paru en 1925 dans *Parasitology* — et nous remercions son auteur de nous avoir permis d'en assurer la traduction en français.

Dobell utilisa pour ses recherches une souche d'*E. histolytica* d'un macaque espèce en tous points identique à l'*E. histolytica* de l'homme (même morphologie, même comportement en cultures, même action pathogène vis-à-vis des animaux de choix même sensibilité à l'émétine). Le choix d'un macaque permettant à Dobell une surveillance certaine de ses sujets en expérience et des recherches coprologiques régulières.

En décembre 1924, le Docteur Laidlaw ainsi qu'on l'a vu découvre le rôle de l'amidon dans le dékystement et l'enkystement des amides dysentériques. Ces nombreux kystes formés à 37° meurent rapidement si on les conserve à cette température. Dobell les expose pendant deux jours à la température du laboratoire, les ensemence en milieux *de*

culture neufs, frais, et obtient le lendemain une abondante culture d'amibes. Portant à 9 jours la durée de conservation des kystes à la température du laboratoire pour être sûr de l'expérience en détruisant les formes végétatives et obtient à nouveau des cultures abondantes d'amibes.

Pour la première fois on avait donc obtenu, hors de son hôte, le cycle évolutif complet d'*E. histolytica*.

Ce résultat acquis, Dobell se remit au travail et s'entourant de toute les précautions possibles, il étudia, un à un, les différents stades du cycles évolutif.

Sa souche (K. C. 28) fut isolée à partir d'un *macacus sinicus* infecté par *E. histolytica* et *E. nana* dont il étudia les déjections pendant 18 jours, par examen microscopique et par cultures pour essayer de déterminer d'autres infections possibles.

Sûr de cette seule infection, en septembre 1926, il soumet à l'action d'une solution d'acide chlorydrique à 20 % pendant une demi-heure, pour en éliminer les formes végétatives, un culot concentré et lavé de selles riches en kystes ; il fait ingérer ces kystes ainsi préparés à un jeune chat (Kitten C. 28) qui, six jours après, présente un syndrome typique de dysenterie aiguë avec des formes végétatives d'*E. histolytica* dans les fèces. A partir de ces formes végétatives, il obtient sur des milieux à l'amidon de nombreux kystes qu'il conserve 6 jours à la température du laboratoire. Il les réensemence sur milieux frais, obtient à nouveau des formes végétatives et les cultive régulièrement depuis lors.

Assuré à ce moment-là d'avoir une souche « pure » d'amibes *E. histolytica*, aux caractères culturaux identiques, il nous donna alors la description du cycle évolutif de l'amibe.

Le cycle évolutif

Dans ses grandes lignes assez simples, il comporte les stades successifs suivants :

Des amibes se développent, se multiplient, puis s'enkystent, leurs kystes donnent naissance à d'autres amibes qui, après un stade de division et de différenciation, se développent, se multiplient, puis s'enkystent à nouveau, chacun de ces stades correspondant à une morphologie particulière d'*E. histolytica* que Dobell énumère ainsi :

1. Amibes végétatives (amibes trophiques de Dobell) ;
2. Amibes prékystiques ;
3. Le phénomène de l'enkystement ;
5. Les amibes métakystiques de Dobell (amibes jeunes issues des kystes qui par division deviennent les amibes trophiques).

I. L'Amibe trophique

Semblable à *E. histolytica* trouvée dans l'intestin de l'homme et souvent décrite, cette amibe de culture présente quelques caractères particuliers.

Différentes en cela des amibes trouvées dans les fèces des dysentériques à la phase aiguë de la maladie ou dans les déjections des animaux infectés expérimentalement, les amibes trophiques, se nourrissant de bactéries, ne contiennent aucun globule rouge dans leur intérieur. Leur taille est également plus petite et leurs protoplasmes moins clairs.

Par contre, dans les milieux contenant de l'amidon de riz, les amibes dysentériques, ingérant de nombreux grains de cet aliment figuré, atteignent des dimensions anormales.

Mais le noyau des amibes de culture *est identique en tout point* à celui des amibes dysentériques de l'hôte original ou du jeune chat inoculé.

Chaque noyau a un petit karyosome central et une fine couche périphérique de chromatine.

Le karyosome paraît constitué par une masse sphérique de chromatine entouré d'une zone plus claire, cette masse sphérique de chromatine étant elle-même constituée par un

centriole et des granules au nombre de 5 à 8 à la périphérie.

La partie du noyau comprise entre le karyosome central et la couche périphérique de chromatine, en général sans chromatine, peut montrer sur certaines préparations quelques granules et une texture alvéolaire faites de fines radiations de chromatine ; mais pour Dobell, alvéoles et traits radiés seraient des artefacts.

L'amibe prékystique

Un peu plus petite que l'amibe trophique, sa taille est proportionnée à celle des kystes auxquels elle donnera naissance.

Leur protoplasme ne contient plus d'inclusions (grains d'amidon ou bactéries) mais du glycogène, mis en évidence par sa réaction iodophile, et quelques fois des bâtonnets sidérophiles.

Ces formes prékystiques ont un noyau caractéristique : couche de chromatine périphérique un peu plus épaisse, karyosome un peu plus volumineux et légèrement excentrique ; elles vérifient ainsi la description que Dobell en avait donnée en 1919.

L'ensemble des caractères de ce noyau indiquant pour cet auteur que ces amibes sont le résultat d'une division récente.

L'enkystement

E. histolytica s'enkyste en cultures comme elle le fait dans l'intestin de l'hôte normal. Selon Dobell l'amibe met environ deux heures pour passer du stade prékystique au stade kyste uninucléé, l'enveloppe du kyste étant extrêmement fine et rendant difficile l'observation précise de la durée de sa formation.

Les kystes.

En tout point semblable à ceux formés dans l'intestin, ils passent du stade uninucléé au stade quadrinucléé après deux divisions nucléaires successives. Contenant un peu plus de glycogène que les kystes ordinaires, étant donné leur mode de nutrition, ils sont d'un diamètre moyen de 13μ,5 (allant de 10 μ à 16 μ) et de forme ronde, très rarement ovales ou de formes irrégulières.

Il faudrait d'après Dobell, 6 heures pour passer du stade kyste uninucléé au stade kyste mûr à quatre noyaux. Ce chiffre est le résultat d'observations portant sur un très grand nombre de kystes, mais rendues difficiles par les degrés divers de maturité des kystes d'une même culture, d'où les réserves de l'auteur quant à son exactitude.

La longévité des kystes de culture serait due à leurs abondantes réserves alimentaires, mais serait facteur de la température ; une température basse diminuant leurs métabolismes et leur donnant une survie plus longue.

Les kystes de culture peuvent, si le milieu où ils se sont formés s'y prête encore, donner naissance à de nouvelles amibes. Si le milieu est devenu défavorable (pH alcalin, flore microbienne abondante, etc), ils dégénèrent et doivent être réensemencés sur des milieux neufs.

Dans des solutions de Ringer, ou dans de l'eau distillée, les kystes à quatre noyaux peuvent vivre à la température ordinaire pendant 2 ou 3 semaines, quelquefois 4 ou 5. A 37° leur survie dans les mêmes conditions est de quelques jours seulement : la dessication les tuant instantanément.

A la température ordinaire les kystes à un noyau cessent de se développer et, l'ayant subie, demeurent incapables, même remis à l'étuve, de reprendre et d'achever leur développement.

Les kystes a plus de quatre noyaux.

Le développement des kystes s'arrête en général au stade quadrinucléé, mais un ou plusieurs noyaux peuvent continuer à se diviser et donner ainsi naissance à des kystes en contenant un nombre anormal.

Dobell en a observé quelques-uns dans ses cultures : de taille légèrement supérieure aux kystes ordinaires (ils atteignent 15 à 18 et contiennent le plus souvent huit noyaux. Les kystes à cinq, six ou sept noyaux étant beaucoup plus rares.

Les dires de Dobell exposés dans son livre *The Amœbae living in man* selon lesquels il existe des kystes à huit noyaux d'*E. histolytica* pouvant être confondus avec des kystes d'*E. coli* se trouvent vérifiés, du fait même qu'il employa pour cette étude des souches « pures » d'*E. histolytica.*

Le dékystement

C'est sur ce point que le travail de Dobell apporte les vues les plus neuves et les plus intéressantes, les études antérieures sur ce point ne nous offrant que des hypothèses erronées, ou invérifiables.

C'est après avoir observé le phénomène sur *plusieurs centaines* de kystes, soit de la souche K c 28, soit d'autres souches que Dobell en donna la description que nous traduirons en détail. « Comme toutes les souches se dékystent de la même manière, toutes choses égales d'ailleurs, je considère le processus que je vais décrire comme normal.

Pendant le dékystement tout le protoplasme et les quatre noyaux s'échappent à travers une perforation minime de la paroi du kyste.

... Les kystes laissés à la température du laboratoire pendant une semaine furent mis en cultures dans des tubes à la même température, puis à l'étuve à 37°...

Pendant les deux premières heures d'incubation les bâtonnets sidérophiles diminuent, se colorent moins fortement, puis disparaissent, le protoplasme devenant à ce moment-là très clair ; les kystes ne se développant pas tant que les bâtonnets sidérophiles et les réserves de glycogène n'ont pas disparus.

Dès leur disparition le protoplasma commence à être agité de mouvements d'ondulation ; il se sépare complètement de l'enveloppe du kyste; ainsi libéré le protoplasme montre des mouvements de plus en plus actifs et de nombreux pseudopodes formés sur différents points sont émis vers la périphérie du kyste. Très souvent ils pressent sur la paroi en certains points, comme si l'organisme entier cherchait une issue. Tôt ou tard les mouvements deviennent moins rapides et un pseudopode est appliqué en un seul point de la surface interne de la paroi du kyste. Très peu de temps après son extrémité sort à travers un trou minuscule invisible auparavant sur cette paroi et apparaît comme une petite hernie à l'extérieur.

Je ne sais comment se fait cette perforation, mais j'imagine que l'amibe sécrète un ferment qui dissout la paroi. Le protoplasme fait issue rapidement à travers le trou, mais l'organisme entier n'émerge pas immédiatement de cette manière. Lorsqu'une petite portion du protoplasme est sortie, elle rentre à nouveau à l'intérieur du kyste. Cette opération se répète plusieurs fois, mais à chaque fois un peu plus de protoplasme émerge jusqu'à ce que finalement, l'organisme entier se libère complètement de son enveloppe, l'extrémité du dernier pseudopode restant prison-

nier dans l'orifice; l'amibe commence alors à se mouvoir, traînant après elle, son enveloppe vide.

Les noyaux passent un par un à travers l'ouverture, déformés au passage, ils reprennent rapidement leur forme, puis se groupent tous.

L'amibe ayant ainsi fait issue hors de son enveloppe ingère rapidement bactéries et grains d'amidon...

L'espace compris entre le protoplasme et la paroi du kyste s'agrandit peu à peu, se remplissant de liquides et contenant des granules colorables avec du rouge neutre. Je considère ceci comme une excrétion...

L'amibe encore prisonnière se déplace traînant sa coque encore un moment, puis se libère définitivement, se mouvant alors très rapidement.

Lorsque le dékystement est complet, le kyste vésicule sphérique pleine de liquides, de granules et contenant parfois un morceau de protoplasme sacrifié par l'amibe au moment où elle se libère, est visible pendant quelques heures, puis se désintègre et disparaît ; en général l'ouverture de l'amibe se referme, mais on peut quelquefois l'apercevoir avec ses bords rétroversés.

La durée du phénomène varie : il faut une demi-heure environ à l'amibe pour se libérer (à partir du moment où le protoplasme commence à être animé de mouvements jusqu'à ce qu'il soit entièrement sorti) ; parfois un quart d'heure suffit, d'autres fois une heure est nécessaire.

Quelques kystes commencent à éclore après 2 heures 30 seulement d'incubation, et de la troisième à la cinquième heure on trouve tous les stades du phénomène. Les kystes qui n'ont pas éclos à la douzième heure commencent à dé-

Tel est d'après Dobell le processus normal du dékystegénérer ».
ment.

L'Amibe métakystique.

On croyait jusqu'alors que le kyste donnait naissance à quatre amibes uninucléées ou à une seule amibe uninucléée qui se divisait plus tard en quatre amibes uninucléées.

Dobell montre que ces deux hypothèses étaient fausses ;

L'hypothèse n° 1 est infirmée ainsi qu'on l'a vu par l'issue hors du kyste d'une amibe unique quadrinucléée.

Le développement de l'amibe métakystique va infirmer l'hypothèse n° 2.

Dobell précise d'abord six points essentiels du développement de l'amibe métakystique.

1° Le développement de l'amibe métakystique n'est qu'un procédé de subdivision ; aucun phénomène de conjugaison ou de division des individus ou des noyaux ne se produit.

2° La nouvelle amibe quadrinuclée ne se divise pas en amibes uninuclées directement, mais par des stades successifs.

3° *L'amibe initiale à quatre noyaux donne naissance en définitive, non pas à quatre amibes uninuclées, mais à huit amibes.*

4° Chaque division du cytoplasme est précédée par une *division nucléaire.*

5° Chacun des noyaux initiaux ne se divise *qu'une fois* au cours du développement métakystique.

6. Entre deux divisions successives du cytoplasme il y a une période intercalaire de développement de l'amibe.

Pour la clarté de l'exposé que va donner Dobell ce dernier propose la terminologie personnelle suivante :

Il appellera

— *noyau kystique* (N), chacun des quatre noyaux contenus dans le kyste ;

— noyau-fille (danghter-nuclei) (n). les noyaux issus de la division du noyau kystique ;

— amibes (*amœbae*), aumoment de son issue hors du kyste ;

— Amœbules (*amœbulae*) l'amibe résultant de la division — et il résume ainsi l'évolution du stade métakystique.

Une amibe (*Amœbae*) a quatre noyaux kystiques (N. N. N. N.) se divise en huit amœbules (*Amœbulae*), contenant chacune un noyau (n).

Mais de multiples combinaisons nucléaires peuvent se produire et compliquer d'autant le développement de l'amibe métakystique — et nous ne décrirons que le processus le plus fréquent.

« L'amibe métakystique venant de faire issue hors du kyste mesure environ 11 cm. de diamètre. Se déplaçant rapidement et ingérant de nombreux organismes, elle se développe et atteint au bout de 2 ou 3 heures 16 à 20 cm. Les noyaux augmentent aussi leurs dimensions, atteignent 4 cm., restant adhérents les uns aux autres...

Lorsque l'amibe a atteint son plein développement, un de ses quatre noyaux commence à se diviser, la division se faisant selon le mode décrit précédemment. Les noyaux perdent leur pouvoir attractif et se séparent. Le noyau issu de cette première division s'éloigne et l'organisme s'allonge, comme il le fait lors de la division des formes trophiques.

Un étranglement transversal du cytoplasme se produit jusqu'à la séparation complète des deux individus — l'un contenant un noyau N et un noyau issu de la bipartition, l'autre deux noyaux N. N. et l'autre noyau issu de la bipartition, soit :

une amibe N. n
une amibe N. N. n.

Ces deux amibes filles se développent et se divisent ensuite selon le même mode.

A. Division de l'amibe N. n.

Le noyau N. se divise à son tour, et il y a après division du protoplasme formation de deux amibes

une amibe N.
une amibe N. n.

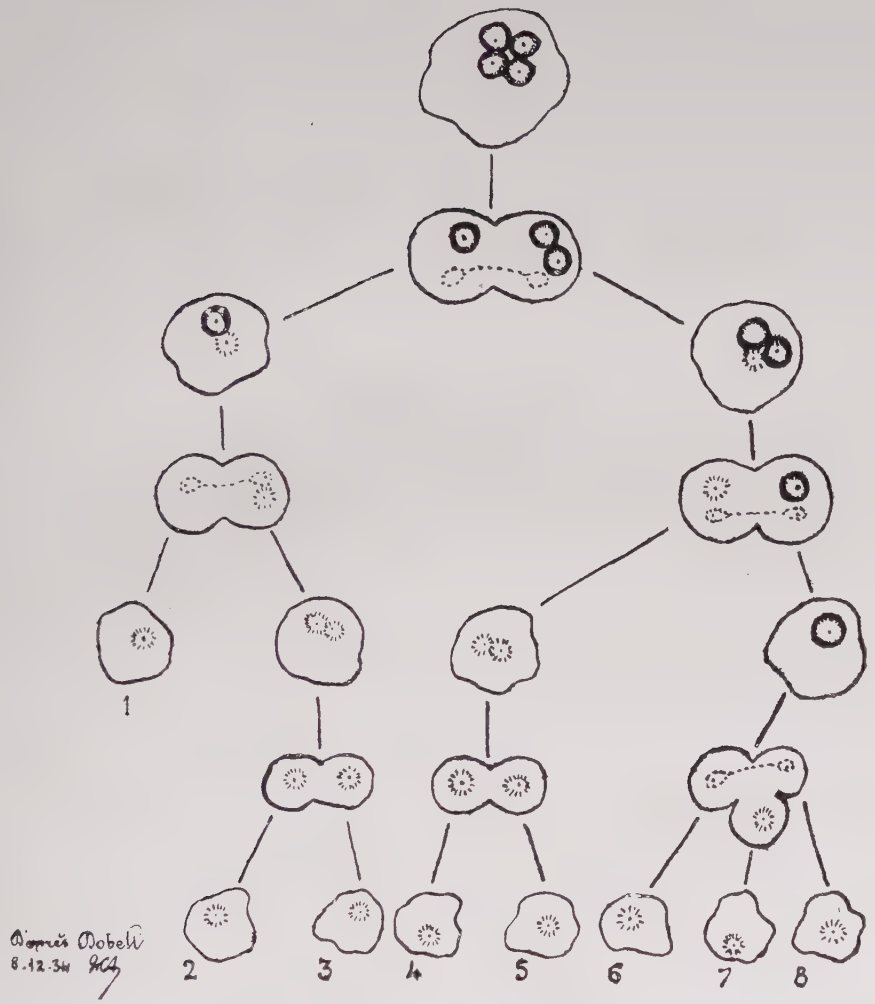

Schéma (d'après DOBELL).

De la division de l'amibe métakystique selon le mode le plus souvent observé.

(Bipartition au début en deux amibes ayant comme noyaux :
a) NNn ; *b*) Nn.

L'amibe n. est selon la terminologie de Dobell l'amœbule n° 1.

L'amibe n. n. se divisera à son tour et on obtiendra deux amibes (n) et (n), amœbules 2 et 3.

B. Division de l'amibe N. N. n.

Un des noyaux N. se divise et l'on a :

une amibe N. n.
une amibe n. n.

a) Division de l'amibe N. n. Par simple division protoplasmique on aura deux amibes n. n.: amœbules 4 et 5.

b) Division de l'amibe N. n. Il y a division du noyau N. et formation de

une amibe n. (amœbule n° 6)
une amibe n. n.

L'abime n. n. se divisera à son tour et donnera les deux *amœblae* finales n° 7 et 8.

Il peut arriver qu'après la division du noyau N., comme le montre le schéma, qu'il y ait directement division tripartite et obtention des trois *amœbulae* finales n°s 6, 7 et 8.

Cette méthode de division est la plus fréquente. Mais il est évident que l'amibe métakystique à quatre noyaux N. N. N. N. ne se développera pas toujours de la même manière. Sa division peut commencer de cinq manières différentes.

La première est celle qui vient d'être décrite en détail.

Par ordre de fréquence dans les cultures, on peut observer :

N° 2 : un noyau kystique N. se divise en n. n. ; un des noyaux n, après division protoplasmique, donnera naissance directement à une *amœbulae* n (n° 1) ; l'autre noyau n donnant avec les trois noyaux kystiques une amibe quadrinucléée N. N. N. n.

N° 3 : après division d'un noyau kystique N. dans l'amibe métakystique quadrinucléé N. N. N. N., le cytoplasme peut à son tour se diviser, non pas en deux mais en trois parties, et donner naissance à trois amibes :

a) une amibe N.
b) une amibe N. n.
c) une amibe N. n.

N° 4 : Rarement la première division nucléaire peut n'être suivie daucune division protoplasmique et on a une amibe à cinq noyaux N. N. N. n. n. qui se développera selon le mode normal.

N° 5 : Très rarement la première division du noyau peut être suivie d'une division protoplasmique donnant naissance à quatre amibes filles ; on a alors formation des amibes suivantes :

a) une amibe N. N.
b) une amibe N.
c) une amibe n.
d) une amibe n.

Il est aussi évident que les amibes peuvent contenir un nombre varié de noyaux (de 1 à 4), et, comme les noyaux peuvent être de deux sortes (N. et n.), quatorze sortes d'amibes sont possibles.

4 noyaux :	NNNN,	NNNn,	NNnn,	Nnnn,	nnnn	= 5
3 noyaux :	NNN,	NNn,	Nnn,	nnn,		= 4
2 noyaux :	NN,	Nn,	nn,			= 3
1 noyau :	N,	n,				= 2
					Total :	14

On peut résumer dans un tableau les divisions possibles de l'amibe à quatre noyaux N. N. N. N.

Amibes quadrinuclées :

On peut trouver les amibes métakystiques suivantes :

N.N.N.N., N.N.N.n., N.N.n.n., N.n.n.n.

1. — N.N.N.N.

Division d'un noyau (N) donnant N.N.n.n. qui peut se diviser soit en :

a) par bipartition en :

N.N.N.n. et n.
N.N.n. et N.n.

b) par triple division en :

N.n. et N. n. et N.

c) par quadruple division en :

N.N. et N. ; et n, n.

2. — N.N.N.n.

Division d'un noyau (N) donnant N.N.n.n.
Par bipartition on aura :

N.N.n.n. et n.
N.N.n. et n.n.
N.n.n. et N. n.

3. — N.N.n.n. (assez rare)

Division d'un noyau (N.) donnant N.n.n.n.n.
Par bipartition on aura :

N.n.n.n. et n.
N.n.n. et n. n.
N.n. et n.n.n.n

4. — N.n.n.n. (très rare)

Division d'un noyau (N.) donnant n.n.n.n.n.
Par bipartition on aura :

n.n.n.n. et n. (n'a pas été observé).
n.n.n. et n.n.

Cette division de l'amibe métakystique serait terminée après 11 heures ou 13 heures d'incubation.

Les 8 amoebulae se développent rapidement et en quelques heures deviennent des amibes trophiques ; ce ne sont point des « gamètes » car l'étude prolongée de ces phénomènes de division permet à Dobell d'assurer qu'il n'y a pas de « cycle sexué » au cours de ce processus.

Les travaux antérieurs a 1925 sur le cycle de développement :

Cette description précise du cycle de vie, résultats de l'examen de nombreuses souches d'*E. histolytica,* dont les principales phases ont été revues à nouveau par de nombreux auteurs depuis 1928 va nous servir de terme de comparaison pour juger les travaux faits sur ce point avant Dobell.

Noc en 1909, Darling, en 1913 avaient signalés qu'en chambre humide les parois des kystes disparaissaient peu à peu donnant naissance à quatre amoebules qui traînaient leurs coques derrière eux pendant un moment.

On voit l'erreur des deux auteurs, sans être sûr que ce ne soient pas des amibes libres qui aient été observées.

Penfold, Woodcock et Drew en 1916 étudièrent le dékystement d'*E. histolytica* dans des milieux contenant des liquides pancréatiques, le dékystement paraissant dû à ce moment-là à l'action du suc stomacal ou pancréatique sur les parois du kyste. Après 5 à 6 heures d'étuve le protoplasme commencerait à se rétracter, les contours deviennent moins nets ; un point du protoplasme s'applique en un point de la paroi du kyste, qui se dissout(et l'amibe sort

à travers ce large orifice (1/8 de la circonférence du kyste) l'enveloppe du kyste apparaissant comme un « anneau sphérique ».

On voit que l'ouverture est beaucoup plus grande que celle décrite par Dobell ; ce dernier d'ailleurs en 1919 ne put en employant la méthode de culture de ces auteurs observer à nouveau ce phénomène.

Un seul point est en accord avec la description actuelle : l'issue hors du kyste d'une seule amibe et non de quatre amoebules, sans précision quant aux nombres de noyaux.

Yoshida, en 1918 et en 1920 publiait un travail sur ce sujet ; il annonçait qu'il avait pu saisir le cycle de l'*E. histolytica* dans son ensemble.

Ses cultures faites à 29°, et la description qu'il donne des différents stades fait douter qu'il ait pu analyser en détail chaque stade du développement. A la même époque Cutler annonçait qu'il avait réussit à cultiver *E. histolytica* et obtenu le dékystement des amibes de culture.

En se servant des méthodes décrites par Penfold, Woodcock et Drew, il assista au dékystement d'un certain nombre de kystes et à la formation d'amibes uninuclées — en ajoutant du suc gastrique et du suc pancréatique à ses cultures, il constata à nouveau la formation de quelques amibes uninuclées, la majorité étant quadrinuclées. Il ne décrit pas les cycles de vie qui suivent la formation de telles amibes qui pour lui se déplaceraient dès leur formation sans ingérer de microbes.

Cutler semble bien avoir vu la formation d'amibes à quatre noyaux après l'éclosion hors du kyste mais il est en désaccord avec Dobell quand il dit que les amibes n'ingèrent aucune nourriture et surtout quand il dit que ces amibes quadrinuclées se divisent en quatre amibes (*amoebulae*).

Seul Chatton, en 1917, a donné une description du cycle de vie qui se rapproche de celle de Dobell.

Il fit ingérer des kystes à quatre noyaux d'*E. histolytica* à

de jeunes chats ; et les sacrifia après un temps plus ou moins long et examina le contenu de leur intestin.

Il nota la disparition rapide des corps chromatoïdes, ne vit aucune modification du noyau, mais constata leur groupement « en tetaèdre » dans les amibes quadrinuclées émises hors du kyste ; ces amibes se déplacant rapidement et phagocytant des bactéries.

Chatton a bien vu ces premiers stades du développement de l'amibe métakystique, mais il ne put suivre la formation des 8 amoebules. Le dékystement était pour lui le résultat d'une dissolution de la paroi du kyste.

En 1926, Yorke et Adams essayèrent de suivre ce développement de l'*E. histolytica* en se servant de la méthode des cultures.

Après avoir constaté eux aussi le groupement des noyaux dans les kystes au moment de la libération de l'amibe métakystique, ils disent que l'amibe s'échappe à travers une large ouverture de la paroi du kyste ; cette amibe métakystique quadrinuclée donnant naissance par division soit à deux amibes filles binuclées qui se divisent encore pour donner quatre amoebulae uninuclées.

Ces auteurs ayant même constaté la présence dans leurs cultures d'amibes géantes à 20 ou 40 noyaux, il faudrait d'après Dobell des conditions de culture anormales pour assister à la formation de tels « monstres » selon son expression.

On voit que ces derniers points sont en désaccord complet avec la description de Dobell : ce dernier expliquerait en partie ces différences par l'emploi d'un matériel différent.

La description de Dobell du cycle de l'*E. histolytica*, résultat de l'étude minutieuse de plusieurs souches d'*E. histolitica* provenant de selles d'homme et de Macaques) est illustrée par de nombreux dessins faits d'après des lames fixées et colorées (fixée au liquide de Bouin et colorée par la méthode d'Heiden Hain) qui permettent de retrouver facilement les phases du cycle de vie.

L'exactitude de cette description a été confirmée par des auteurs qui ont retracé sinon dans leurs moindres détails, tout au moins dans leurs grandes lignes les phases du cycle de vie d'*E. histolytica.*

Le cycle de vie de l'*E. histolytica* en culture est-il le même chez l'hôte parasité. Comme le dit Dobell en concluant t:

« Le développement tel que je l'ai vu et décrit... est-il identique à celui qui se place habituellement chez l'homme ? Cela n'a pas encore été déterminé. Néanmoins sa régularité et sa complexité, et l'accord de certaines de ses phases avec celles que l'on sait se passer chez l'homme me permettent de croire que le phénomène auquel j'ai assisté *in vitro* ne doit pas être différent de celui qui s'accomplit — mais qui n'a pas encore été vu, *in viro* —. Je me rends compte d'ailleurs que cette hypothèse ne pourra être vérifiée que par des observations et des expériences laborieuses ».

Cette souche (K. C. 28), cultivée depuis cinq ans et demi a continué à se développer selon le même processus, les conditions de culture étant les mêmes — confirmant encore, si besoin était, les travaux de Dobell faits en 1928.

Un autre point intéressant du développement d'*E. histolytica* précisé par Dobell lors de son étude a été le mode de division du noyau d'*E. histolytica,* aussi avons nous consacré un paragraphe spécial à cette question. Le mode de division n'est pas encore fixé d'une manière certaine, mais Dobell qui continue actuellement à travailler la question semble avoir retrouvé les descriptions qu'il en donnait en 1919.

*La division nucléaire d'*E. histolytica *en cultures.* — Déjà décrits par de nombreux auteurs ces phénomènes n'avaient toujours donné lieu qu'à des descriptions discordantes, étant donné les matériaux d'études différents employés (selles de l'homme, lésions d'intestin d'animaux inoculés).

Pour Schaudinn c'était une amitose, pour Chatton, Ma-

THIS et MERCIER une mésomitose ; DOBELL en 1916-1919 ayant étudié ces phénomènes dans des coupes d'ulcères intestinaux de chats infectés expérimentalement disait que c'est une division binaire dont il donnait la description dans son livre *The Amoebae living in man* (1919). KOFOID et SWEZY retracèrent des stades de mitoses et critiquèrent les travaux de DOBELL, l'intestin de chat employé par ce dernier n'étant pas pour eux un matériel d'étude convenable par cette description . URIBE devait aussi donner du phénomène une description se rapprochant de celle de KOFOÏD et SWEZY.

Mais DOBELL retrouve dans ses cultures les mêmes phénomènes de division déjà observés par lui ; son étude minutieuse portant sur un très grand nombre de préparations fixées et colorées lui montra à nouveau les différents stades de prophase, formation de deux fuseaux de chromatine et quatre télophases.

Malgré tout les résultats qu'il a publiés ne sont pour lui que des résultats approximatifs la description des premiers stades nécessitant encore de nouvelles recherches.

Il y a en effet pour lui, deux points difficiles à préciser : le nombre des chromosomes et leur origine.

Pour DOBELL dans son travail de 1928, le nombre de chromosomes serait de 5 à 8 ; des renseignements récents que nous tenons de l'auteur (lettre du 19 novembre 1934), nous montrent que pour lui la question n'est pas encore résolue et que ces chiffres sont provisoires.

D'après lui les chromosomes proviendraient des granules fortement colorés situés à la périphérie du Karyosome, sans que cela soit certain.

Les télophases plus faciles à observer se caractérisaient par :

1° persistance des fruseaux ;

2° absence ou mise en évidence difficile d'un Karyosome, mais présence de granules colorables (chromosomes ?)

et plus tard, 3° différenciation progressive d'un karyosome excentrique.

Cette description si elle confirme ses premiers travaux est temporaire, Dobell continuant l'étude de cette « mitose particulière ».

Le pouvoir pathogène des amibes de culture.

Dobell à la fin de sa description du cycle évolutif laissait entendre que les notions nouvelles allaient entraîner de nouvelles conceptions du rôle pathogène et du mode d'action de l'*E. hystolytica.*

Il avait en effet dans une publication antérieure étudié les variations de virulence d'une souche d'*E. histolytica* cultivée sur un milieu contenant de l'amidon de Riz. Alors que Boeck et Drbohlav avaient eu des résultats très nets en inoculant des chats par voie rectale avec des amibes de culture, Dobell ne pouvait réussir à produire chez les chats en expérience une dysentérie même bénigne et ne vit aucune lésion de l'intestion à l'autopsie.

En 1928, Rees inoculant de jeunes chats avec des amibes de culture, directement dans l'intestin après laparotomie avait les résultats suivants : 7 chats infectés sur 13 inoculés. Il incriminait l'amidon de riz qui pour lui diminue le pouvoir infectant des amides d'*E. histolytica.*

Sautet en 1929, aura des résultats contraires avec trois souches d'*E. histolytica* ; il pourra donner aux chats inoculés une dysentérie mortelle, mais il constatera que certaines souches sont plus virulentes que d'autres et pour lui l'amidon de riz n'altère pas *dans tous les cas* le pouvoir patogène d'*E. histolytica* vis-à-vis du chat.

Simic arrivera aux mêmes conclusions mais recommande le passage sur ces animaux de temps à autre des souches d'*E. histolytica* cultivées sur des milieux contenant de l'amidon de riz pour couserver à ces souches leur pouvoir pathogène.

Chiba et Kuwabara avec 6 souches cultivées sur milieu de Tanabe et Chiba pendant 200 jours ont inoculé avec succès des animaux qui présentèrent rapidement une inflammation du gros intestin avec formation d'ulcération typique. L'ami-

don de riz ne jouerait aucun rôle dans la disparition du pouvoir pathogène de certaines souches d'*E. histolytica.*

Rees, en 1931, obtient de meilleurs résultats en inoculant des amibes cultivés directement dans les selles de malades qu'avec des amibes de culture.

Cleveland *et* E. Sanders infectent le chat par des inoculations dans le foie de culture d'*E. histolytica,* et produisent la formation d'abcès du foie chez 16 chats (sur 79 chats inoculés) ; ils constatent qu'après plusieurs passages sur animaux, la virulence de la souche augmente et le taux des résultats positifs devient plus élevé.

Dobell, en 1931 publie les résultats d'essais d'inoculations de chats avec des souches d'*E. histolytica* de Macaques.

Il essaya d'inoculer des chats avec des souches mises en culture récemment et avec des souches de culture ancienne ; il n'eut aucun résultat dans les deux cas.

Il recommenca avec une autre souche et réussit à donner une dysentérie typique aux chats inoculés ; il recommença son expérience en se servant de kystes prélevés dans les selles du Macaque qui avait été à l'origine de cette souche infectante et réussit encore à infecter deux chats.

Il essaya alors d'infecter des Macaques d'espèces différentes avec des souches d'*E. histolytica* de Macaques, et il put infecter un Macacus sinicus avec une souche isolée à partir d'un autre macacus sinicus : un macacus sinicus avec une souche de Macacus Resus ; un Macacus Sinicus et un Macacus Rhesus avec une souche de M. Nenestrimus.

Ces résultats furent obtenus avec des souches en culture depuis un an et sur des milieux avec ou sans amidon de riz.

Il faut noter aussi que les Macaques furent infectés — c'est-à-dire que l'on retrouva des *E. histolytica* dans leurs selles — mais n'eurent pas de dysenterie aiguë.

Il essaya ensuite d'infecter des Macaques avec une souche isolée à partir des fèces d'un homme atteint de dysenterie aiguë.

Après deux ans et demi de culture, il put infecter avec cette souche un Macacus sinicus : isolée à partir de ce cas après deux ans de culture elle infecta un M. Rhesus.

Et la souche originale, après 5 ans de culture infecta un M. Sinicus et un M. Rhesus.

Cette même souche (D) à partir de son 66e jour de culture se montra inoffensive pour le chat ; Dobell essaya en 1925, 1927, 1930 d'infecter sans y réussir ces animaux.

Une autre souche isolée à partir des selles d'un porteur de kystes se montra infectante.

Devant ces résultats, Dobell essaya d'exalter la virulence de ces souches en culture par passages sur le Macaque ; de nouvelles expériences faites sur le chat n'eurent aucun résultat.

Comme on le voit, certaines des souches d'*E. histolytica* au bout d'un certain temps de culture semblent perdre leur pouvoir pathogène pour le chat — et ces mêmes souches demeurent infectantes pour les Macaques et transmissibles d'une espèce à l'autre.

Il faut ainsi distinguer le pouvoir pathogène du pouvoir infectant d'une souche ; les expériences faites sur le chat nous montrent qu'une souche d'*E. histolytica* peut perdre son pouvoir infectant et pathogène pour une espèce animale (chat et le conserver (pouvoir infectant) pour une autre espèce animale (macaque), que ce pouvoir infectant ou pathogène diffère d'un individu à l'autre d'une même espèce et nous verrons dans le dernier chapitre de cette thèse comment on peut concevoir la pathogénie de l'amibiase d'après ces notions.

L'APPLICATION DE LA MÉTHODE DE CULTURE DE l' « E. HISTOLYTICA » AU DIAGNOSTIC DE l'AMIBIASE

On sait que la difficulté de faire un diagnostic précis d'infection amibienne ; les signes cliniques, l'histoire de la maladie, les anamnestiques peuvent aiguiller vers ce diagnostic, mais seule la découverte de l'*E. histolytica,* dans les selles du malade, permettra de reconnaître la vraie nature du syndrome dysentérique observé.

Cette recherche du parasite est relativement facile dans les épisodes aigus de la maladie, les amibes restant nombreuses dans le mucus et les glaires rejetés par le malade. Elle est beaucoup plus difficile dans les cas subaigus ou dans les cas chroniques, l'élimination du parasite étant irrégulière et nécessitant des examens répétés.

A. Dans les épisodes aigus.

Nous avons indiqué, au chapitre des techniques les modes de prélèvements des mucosités riches en matériel amibien ; nous les rappellerons brièvement.

Prélèvement transrectoscopique du mucus et des glaires à l'aide d'une tige terminée en palette ou, si l'emploi du rectoscope n'est pas possible, prélèvement transanal à l'aide d'une pipette en verre épais, peu étirée, armée d'une tétine en caoutchouc permettant d'aspirer, et rejet du tampon de coton monté, cause de dessication rapide du prélèvement, les amibes dégénérant complètement et ne pouvant être étudiée à l'étuve de Foot et cultivée.

L'examen entre lame et lamelle d'un peu de mucus à l'étuve de Foot suffit, en général ; cette étuve, indispensable dans les laboratoires où l'on étudie les amibes permet d'étudier, à la température favorable, les mouvements caractéristiques du parasite, (pseudopodes rapides, clairs).

Si cet examen n'est pas faisable ou que le matériel prélevé soit en quantité minime, on peut alors se servir de la méthode des cultures. Véritable méthode d'enrichissement, elle permet l'examen dans de meilleures conditions d'un matériel amibien plus abondant.

Grâce aux travaux de Simitch, l'action du froid sur les formes végétatives étant mieux connue, on peut, après dilution du matériel prélevé dans de la solution de Rirger-Lake ou du sérum physiologique faire cet examen ou ensemencer. Quelques heures après, et non pas dès l'émission des glaires ou dès le prélèvement fait « au lit du malade ».

Ces méthodes sont employées actuellement et donnent d'excellents résultats.

B. Dans des cas chroniques.

Un fait domine : l'élimination irrégulière des kystes dans les selles ; cette élimination faisant alterner des périodes négatives et positives (au point de vue diagnostic).

C'est pourquoi des examens de selles isolés ayant eu un résultat négatif n'ont aucune valeur. Il faut des examens répétés et suivis pendant huit jours pour augmenter les chances d'un diagnostic exact, comme l'a conseillé R. Desbhiens, (en admettant que cette période de huit jours soit la durée maxima de non-élimination des kystes).

En pratique, cette méthode est peu commode ; on peut se contenter d'examiner au bout d'une semaine un mélange de huit échantillons de selles, prélevées quotidiennement par le malade et mis dans un récipient légèrement formolé pour éviter l'envahissement rapide et moisissures. Si le formol n'altère pas la morphologie du kyste, il le détruit rapidement, empêchant ainsi tout essai de culture ultérieur.

Un autre procédé permet d'avoir un diagnostic plus sûr: c'est de provoquer, chez le porteur de kystes, une diarrhée « expérimentale » amenant l'apparition de formes végétatives dans les selles.

Divers moyens peuvent être employés, comme nous l'avons vu :

L'absorption de bile, selon le procédé de Le Noir et Mathieu de Fossey ;

Le lavement iodé, l'injection intra-veineuse de cyanure de mercure doit être déconseillée ; comme le dit Terrial, elle peut provoquer des hémorragies intestinales ou réactiver une syphilis latente.

C'est la purgation par purgatif salin (Sulfate de Soude, sulfate de Magnésie) par doses de 5 grammes pendant 3 ou 4 jours qui doit être le procédé de choix — il y a ainsi un certain degré d'irritation intestinale et formation de selles pâteuses, condition favorable de l'examen.

Pour les malades qui ne veulent pas prendre de purgatifs salins — Terrial cause de l'emploi de calomel, poudre de réglisse composée ou même des produits à base d'agar-agar ou autres macilages —. Nous déconseillons l'emploi de purgatifs à base de phenolphtaleine très toxiques. Il est même des malades pusillanismes que le mot diarrhée effraie et qui n'accepteraient aucun de ces procédés.

Il faudra recourir alors à la méthode de Deschiens (examen pendant 8 jours) et la combiner aux différentes méthodes d'enrichissement des selles que nous connaissons :

Méthode de Telemann-Langeron, Telemann-Rivas : Telemann (modifié par Garin, Doubrow, Mounier), Sigalas-Pirot, Carles-Barthélemy si la selle est suffisamment riche en kyste ; sinon les méthodes York-Adams et Yorke, Adams-Bidegaray exposées en détail au chapitre des techniques semblent indiquées.

La culture allait-elle dans cec cas chroniques apporter un élément de succès au diagnostic en permettant la multiplication rapide d'une échantillon pauvre en kystes. Cette

possibilité entrevuedès 1925 par Guérin et Pons, puis par Saint-John, Craig et de nombreux auteurs qui donnent des statistiques semble ne pas avoir donné des résultats aussi nets et aussi probants qu'on espérait.

Saint-John, le premier utilisa cette nouvelle méthode et cite les cas suivants :

1° Un homme avait eu une infection amibienne. Souffrant encore on trouva à l'examen un abcès du foie qui fut opéré et drainé. Au moment de l'intervention, de nombreux examens de selles furent faits selon les procédés habituels, mais aucune amibes dysentérique (kyste à forme végétative) ne fut découverte ; on fit des cultures avec ces selles. Les cultures se montrèrent rapidement abondantes en amibes *E. histolytica,* amibes qui furent cultivées ensuite pendant plusieurs mois.

2° Dans un groupe d'hommes en bonne santé apparente, 61 selles furent examinées.

On trouva ,grâce aux cultures, 6 cas d'infection par *E. histolytica,* alors que par examen microscopique ordinaire 5 cas sur les 6 infectés se montrèrent négatifs.

Devant ces résultats Saint-John concluait : « On peut dire que la multiplication rapide des amibes en culture et leur rassemblement au fond du tube équivaudrait à une méthode d'examen avec possibilité de grandes concentrations.

La valeur pratique de ce procédé repose sur le diagnostic des cas douteux et les contrôles de traitement. »

Il ne semble pas que les statistiques publiées après lui aient aussi éloquentes.

Dans un autre travail qu'il fit avec Charles F. Craig sur cette question il arrive aux résultats suivants :

Sur 71 individus examinés on eut :

avec examen microscopique : 6 cas d'infection par *E. histolytica ;*

après sédimentation : 9 cas.

En culture sur milieu :

Œuf. Solut. de Locke + sérum : 9 cas.

Sur milieu de Craig (milieu liquide), milieu de Locke + sérum : **11 cas.**

Il semble donc que deux cas seulement aient émis en évidence par la technique des cultures, ce qui serait quand même intéressant si les auteurs n'ajoutaient pas :

« Il faut remarquer qu'une *seule préparation* fut examinée à l'examen direct ; ceci aurait entrainé d'autres résultats positifs avec un plus grand nombre de préparations examinées ».

Tripoli, en 1929, donnait une statistique comparative portant sur 300 cas.

Des examens directs et après concentration de nombreux prélèvements de chaque selle furent faits, puis des cultures ; on trouva un certain nombre de malade infectés par *E. histolytica* à l'examen microscopique ; dans 100 % de ces cas, la culture donna des résultats identiques avec amibes abondantes dans les tubes ; dans un seul cas, où des examens répétés faits par des gens expérimentés n'avaient donné aucun résultat la méthode des cultures permit de mettre en évidence une infection par *E. histolytica.*

Forster N. Johns, en 1930, étudie à nouveau cette question sur un plus grand nombre de cas. Sur 614 individus examinés, 50 furent trouvés porteurs d'*E. histolytica.*

Les selles de ces 614 malades furent examinées à l'aide d'examens coprologiques ordinaires et par les méthodes de culture.

49 diagnostics furents faits par examen microscopique ; un seul, négatif à l'examen direct, devint positif après culture.

B. Spector, à propos d'étude statistique comparée entre les méthodes de culture et les diagnostics biologiques dont nous parlerons, dit elle aussi que la méthode de culture est probablement supérieure à l'examen direct.

Poindexter, étudiant à Puerto-Rico les selles de 564 individus par les méthodes coprologiques courantes et par cultures, diagnostiqua 66 cas d'infections par *E. histolytica.*

Dans 4 cas, la culture donna un résultat positif, alors que l'examen microscopique avait été négatif.

On voit donc que le pourcentage des cas d'infections par *E. histolytica* diagnostiqué par examen direct, par sédimentation et par la méthode des cultures, est à peu près le même, mais que les méthodes combinées donnent un pourcentage légèrement plus élevé.

Cette comparaison entre les procédés de culture et les méthodes d'examens copologiques fut le but des essais de culture que nous avons tentés au laboratoire de médecine coloniale.

Nous avons eu l'occasion pendant ces derniers mois d'examiner les selles d'un certain nombre de malades ayant dans leurs antécédents des attaques de dysenterie plus ou moins bien définie, souffrant actuellement de troubles s'apparentant à l'amibiase chronique.

Sur ces 6 malades, l'examen microscopique direct ou après enrichissement des selles révéla chez 5 d'entre eux une infection par *E. histolytica* ; la culture confirma aisément ce diagnostic et nous eûmes facilement, après 24 heures d'étuve dans les milieux convenables, l'apparition de formes végétatives d'*E. histolytica* facilement identifiables à l'étuve de Foot, ou après coloration.

Malgré des essais de cultures répétés, nous ne pûmes mettre en évidence l'existence d'une infection par *E. histolytica* chez le 5e malade (observation n° 3) porteur de kystes certains.

Nous avons noté aussi chez le malade de l'observation 1 le fait suivant : alors que nous avions obtenu facilement une souche aisément cultivable d'*E. histolytica* lors de son premier passage à l'hôpital, nous ne pûmes à son second passage six mois après retrouver dans ses selles des formes végétatives ou enkystées de l'amibe dysentérique malgré de nombreux essais de culture.

Observation I

P. E..., Henri, 36 ans, chauffeur :

Entre dans le service du professeur Bonnin le 26 février 1934, salle 22, lit 21, parce u'il souffre dans la région hépatique.

Embarqué sur le *Cap-Varella,* il y a huit mois, lors de son dernier voyage, le malade commence à ressentir quelques douleurs vagues et passagères, sans causes apparentes dans l'hypocondre droit ; survenant à n'importe quelle heure, accompagné de sensation de pesanteur au niveau de la région épigastrique elles ne cessent pas malgré un régime ; mais bientôt s'accusent. Elles ont alors un début brutal « coupant la respiration » selon l'expression du malade, durant un quart d'heure, puis diminuent peu à peu d'intensité ; elles ont leur siège dans l'hypocondre droit, sous le rebord des fausses côtes et se propagent en arrière vers la pointe de l'omoplate. Devenues journalières depuis quelques mois elles forcent le malade à demonder son admission salle 22.

Antécédents personnels :

Ce malade n'a jamais eu d'accès de paludisme ; *n'a jamais* eu de crises de dysenterie aiguë ou subaiguë, ni même d'épisode diarrhéique passager.

A son entrée à l'hôpital le malade souffre surtout la nuit dans le decubitus latéral droit.

Etat général : malade en mauvaise condition physique, très amaigri.

Appareil digestif, signes fonctionnels : le malade a au réveil des pituites amères, pas d'appétit sans dégoût électif ; légèrement constipé le malade a des selles normales, sans décoloration ni traces de sang.

Signes physiques : la région vésiculaire est douloureuse à la pression, ainsi que la région épigastrique. La manœuvre de Nurphy réveille une douleur au point vésiculaire.

Le foie est augmenté de volume et mesure 14 cm. 5 sur la ligne mammelonnaire.

Appareil respiratoire : légère zone de matité à la base droite.

Rien à signaler à l'auscultation.

Appareil circulatoire : rien à signaler.

Rate légèrement percutable.

Le 1er mars, *examen des selles.*

Quelques kystes à quatre noyaux type *E. histolytica.* Après centrifugation, lavage par la méthode de Yorke-Bidegaray et obtention d'un culot riche en kystes, nous ensemençons sur milieu de Dobell et Laidlaw.

Le 2 mars : repiquage (sub. culture n° 1)

Le 3 mars, dans la sub-culture n° 1 nombreuses formes végétatives d'*E. histolytica* typiques avec pseudopodes hyalins, extrêmement actifs.

Nous repiquons le 3 mars, et du 3 mars aux premiers jours du mois de juillet — date à laquelle nous avons abandonné cette souche, nous avons eu, pendant quatre mois, une souche extrêmement abondante d'*E. histolytica* que nous avons entretenu par des repiquages réguliers sur des milieux variés (gélose de Deschiens et Kipchitzé, milieu à l'asparagine de Tanabe et Ceiba. Sur un milieu de Dobell et Laidlaw avec adjonctions d'amidon de riz et repiquage tous les trois jours, on eut toujours des amibes en grand nombre dans les tubes de culture.

Le malade sort de l'hôpital dans le courant du mois de mai, amélioré par le traitement d'émetine, (pâte de Ravaut, stovarsol) ; il souffre moins, a repris du poids et n'a pas de diarrhée

Au mois de juin le malade séjourne à l'hôpital de Rochefort pour une expertise médicale ; au début de juillet le malade présente tous les signes d'un épanchement pleural du côté gauche ; puis du côté droit dix jours après. Le malade reste à l'hôpital militaire de Rochefort jusqu'au mois d'août ; se soigne chez lui pendant quelque temps, mais son état s'aggravant il rentre salle 22, présentant des signes d'épanchement abondant. Une ponction évacuatrice donne issue à 2 l. 500 de liquide (du côté droit).

La cytologie de ce liquide montre la présence de « cellules mononuclées quelques-unes de forme monstrueuse avec des inclusions graisseuses ».

Le 20 septembre. Nous examinons à nouveau les selles de ce malade à plusieurs reprises par les méthodes coprologiques courantes et par la culture ; il nous sera impossible de déceler

soit des kystes, soit des formes végétatives par cette méthode d'examen.

Observation II

L... Georges, lieuenant d'un groupement méhariste nomadisant dans les confins sahariens.

En 1933, au cours d'un séjour en brousse est atteint d'une crise de dysenterie aiguë — s'étant soigné lui-même (4 injections d'émetine) il voit les symptômes s'amender et son état s'améliorer — il est vu six mois après par le médecin-capitaine des Troupes Coloniales R..., à N'gigmi et présente alors les symptômes suivants :

2 selles diarrhéïques le matin, une au lever, l'autre une demi-heure après, selles chaudes, luisantes, terminées en bouse de vache s'accompagnant d'épreintes légères.

A son retour en France, en avril 1934, il vient consulter M. le professeur Bonnin.

Il souffre alors de troubles digestifs caractérisés par : digestion lente, difficile, quelques selles diarrhéïques, foie légèrement hypertrophié.

La palpation de l'abdomen montre l'existence d'une corde colique gauche très nette et l'examen des selles montre la présence de nombreux kystes d'*E. histolytica* et d'*E. coli.*

Cultivés sur milieux de Dobell et Laidlaw, nous voyons se multiplier au bout de quelques repiquages les *E. histolytica* et disparaître les quelques formes végétatives *d'E. coli* observées dans les premiers tubes de culture.

Après avoir identifié ces amibes sous leur forme végétative, nous abandonnons la souche au bout de huit jours de culture.

Observation III

So... Robert, 32 ans.

Entre le 23 avril 1934 dans le service de M. le professeur Bonnin, salle 22, lit 5, pour des douleurs de la région épigastrique et de l'hypocondre gauche (un ulcère de l'estomac sera diagnostiqué et opéré quelque temps après). On note dans les antécédents personnels un épisode aigu de dysenterie amibienne en Indo-Chine où le malade faisait son service (10 à 15 selles par jour, pâteuses, avec glaires sanguinolentes, douleurs à

la défécation). Hospitalisé il subit une série d'injections d'émetine ; sort de l'hôpital au bout de 3 semaines. Ce malade n'a plus jamais eu de crises aiguës, mais a des selles irrégulières, avec des périodes de constipation.

Du 23 avril au 1er mai nous avons examiné les selles de ce porteur de kystes à plusieurs reprises avant et après de légères purgations au sulfate de soude, l'examen microscopique n'ayant rien montré nous avons cultivé après enrichissement par les méthodes de YORKE-BIDEGARAY de nombreux échantillons de ses selles.

Il ne nous a jamais été possible de mettre en évidence la présence de parasite.

OBSERVATION IV

Ob..., 37 ans, coupeur au Lac Gomé depuis quatorze ans. Ce malade vient consulter M. le professeur BONNIN en juin 1934 parce qu'il a la diarrhée et des troubles digestifs depuis un mois

D'après ce malade, avant son départ du Gabon il aurait eu un épisode diarrhéïque léger au cours duquel un examen des selles aurait montré des œufs de tricocéphales et des amibes vivantes.

A son arrivée à Bordeaux, le 21 juin, le malade se plaint d'avoir tous les matins trois selles coup sur coup avec des glaires ; une sensation de pesanteur après les repas ; n'a plus de vomissements, mais la bouche amère.

Il se plaint aussi de céphalées ; le malade aurait maigri de plusieurs kilos et se trouverait diminué au point de vue résistance physique.

Examiné à ce moment, nous trouvons :

Urines : dépôt nul ; albumine 0.

Sang :

Formule leucocytaire :

Lymphos	14 %
Monos	12 %
Polys	85 %
Eosinos	8 %
Mastzellen ...	1 %

Pas de trypanosomes, pas d'hématozoaires. Réact. de Henry : négative.

Examen des selles :

Nombreux kystes de Giardas,
Nombreux kystes d'E. histolytica.

Le 22 juin : ensemencement sur milieu de Dobell-Laidlaw et sur milieu Deschiens-Kipchidzé.

Sur milieu de Dobell-Laidlaw nous avons une souche d'*E. histolytica* assez précaire que nous entretiendrons avec succès pendant dix jours en la repiquant tous les jours.

Le milieu de Deschiens-Kipchidzé ne nous a pas permi d'obtenir une longévité des cultures de plus de 4 jours.

Observation V

La..., 29 ans, mécanicien à Port-Gentil et Gomé où il fait plusieurs séjours de 1928 à 1934, vient consulter M le professeur Bonnin le 23 juin 1934 pour des troubles digestifs mal définis.

Au point de vue antécédents personnels, il a été impaludé en 1929 au Gabon ; a eu quelques accès de paludisme entre 1929 et 1931, malgré une prise quotidienne de quinine. En 1931, au cours d'un accès palustre il souffre d'un épisode diarrhéïque sans dysenterie.

Examiné à ce moment-là on le trouve infecté par une micropilaire loa ; n'a pas d'hématozoaire, un B. W. négatif et la formule leucocytaire suivante avec éosinophilie.

Lymphos	5 %
Monos	29 %
Polys	50 %
Eosinos	16 %

Au mois de juin 1933, au cours d'un séjour à Port-Gentil, il a un fort accès fébrile supposé palustre soigné par la quinine, et le stovarsol ; depuis cette époque souffre de crises alternées de diarrhée et de constipation. Le malade aurait vu une fois du sang dans ses selles, sang d'origine ano-rectale.

En novembre 1933, au Gabon, le Dr Schweitzer examine ses selles et ne trouve ni kystes ni œufs d'Helminthes.

En juin 1934, le malade se plaint de douleurs en barres ; d'inappétence, d'états nauséeux le matin et de ballonnements post-prandial.

A l'examen : son foie est normal (9 cm. sur la ligne mamelonnaire), la palpation réveille une douleur dans l'angle colique gauche, mais pas de signes de dysenterie.

Examen de sang :

Numération globulaire :

Globules rouges	4.162.000
Globules blancs	5.580

Formule leucocytaire :

Lymphos	37 %
Monos	6 %
Polys	44 %
Eosinos	12 %
Mastzellen	1 %

Filaires Loa.

Examen des selles : nombreux kystes à quatre noyaux type *E. histolytica.*

Le 24 juin : ensemencement d'un culot préparé selon la méthode Yorke-Bidegaray, sur milieu Dobell et Laidlaw.

Le 25 juin : nombreuses formes végétatives d'*E. histolitica ;* on repique le 25 juin et nous entretenons facilement la souche pendant huit jours sur milieux Dobell et Laidlaw contenant de l'amidon. Après identification des amibes dysentériques, la souche est abandonnée.

Observation VI

L... Charles, 33 ans, entre le 3 novembre 1934 à l'hôpital Saint-André, dans le service de M. le professeur Bonnin, salle 22, lit 20, parce qu'il a une diarrhée persistante depuis le mois de septembre 1934.

Cet homme bien portant jusqu'à l'époque de son service militaire qu'il accomplit au Maroc, est atteint en 1923 à Meknès d'une crise de dysenterie aiguë caractérisée selon ses dires par 20 ou 30 selles par jour (glaires et mucus), s'accompagnant de ténesme et d'épreintes. A l'hôpital de Meknès, il subit un traitement « par piqûres » selon son expression et se rétablit ; évacué en 1924, ce malade commence quelques mois après à souffrir de douleurs dans la région hépatique avec irradiations dans l'épaule, crises douloureuses quotidiennes s'accompagnant de diarrhée et de vomissements.

Rapatrié en 1927, ce malade continue irrégulièrement à souffrir de douleurs dans la région hépatique, épigastrique, s'accompagnant de vomissements biliaires à jeun. Cet état n'empêche pas le malade de travailler jusqu'en fin septembre 1934, ou une crise douloureuse dans la région appendiculaire le force à entrer en observation dans le service de M. le professeur Bégouin pour appendicite possible. Ce diagnostic infirmé par l'évolution de la crise (le malade a une crise de dysenterie avec quatre ou cinq selles par jour, selles glaireuses), on le transeate dans le service de M. le professeur Bonnin, le 10 octobre 1934.

Le 15 octobre, nous examinons ses selles. Nous trouvons à l'examen microscopique de nombreux kystes à quatre noyaux d'*E. histolytica*. Après concentration et lavage par la méthode de Yorke-Bidegaray, nous ensemençons sur milieu de Dobell et Laidlaw.

Le 16 octobre : quelques formes végétatives typiques d'*E. histolytica*. On repique le 16 octobre en ajoutant de l'amidon de riz au cultures, des blastocystis s'étant multipliés en grand nombre dans les cultures.

Le 17 : l'amidon de riz a entravé d'une façon nette, par comparaison aux tubes témoins la prolifération des Blastocystis.

Nous repiquerons cette souche tous les deux jours jusqu'au 1er novembre, date à laquelle nous l'abandonnons.

Du 15 au 22 octobre, le malade reçoit une série d'injections d'émetine et quitte la salle 22 en meilleure santé.

Nous voyons donc que la culture de l'*E. histolytica* n'a pas donné dans le domaine de la pratique clinique journalière les résultats que l'on attendait d'elle. Sujette à de nombreuses causes d'échecs, demandant du temps et beaucoup de soins, elle demeure, actuellement, un procédé d'examen supplémentaire que l'on devra combiner aux méthodes copologiques ordinaires.

LES METHODES DE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'AMIBIASE

La culture de l'*E. histolytica* a donné lieu à une série de tentatives de diagnostic biologique de l'amibiase que nous allons exposer après avoir rappelé brièvement les essais antérieurs à 1928.

Des essais nombreux ont été faits pour établir des méthodes de diagnostic de cette maladie, basées sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques, ou de déviation du complément ou par des intra-demo-réactions avec un antigène approprié.

Ce fut Sellards en 1911 qui, le premier, étudia ces « réactions d'immunité » dans l'amibiase.

Son but était surtout de voir si l'on pouvait individualiser par leurs réactions biologiques spécifiques les diverses espèces amibiennes, mieux que par l'étude de leurs caractères morphologiques différentiels encore mal précisés, ou par la méthode des cultures aux résultats contradictoires et douteux.

En injectant des amibes de cultures à des lapins, il mit en évidence l'existence d'une cytolysine spécifique pour l'espèce amibienne en cause. Ceci prouvait donc que les amibes avaient des caractères biologiques distincts.

Mais l'examen des sérums de gens atteints de dysentérie amibienne ne montra pas l'existence d'anticorps spécifiques.

Ces résultats partiels s'expliquent par les techniques de culture insuffisantes, ne permettant pas d'avoir des souches d'*E. histolytica*.

Les essais de diagnostic par l'étude de la déviation du complément.

En 1914, Izar et un autre auteur italien Scalas, en 1923, étudient la fixation du complément dans la dysenterie amibienne.

Scalas emploie un antigène préparé avec du mucus et de petits morceaux de mucosités intestinales que contiennent de nombreuses amibes.

Ces petits morceaux de mucus desséchés à la température de 40° sont dissous dans de l'eau physiologique avec une goutte de phénol. On filtre au bout de 3 ou 4 jours ce liquide, et le filtrat est conservé à la glacière.

Opérant avec un « antigène dysenterie bacillaire » comme test de contrôle, il étudie plusieurs cas et voit les sérums de ses malades donner une réaction nette avec l'antigène mucus, alors le test « antigène dysenterie bacillaire » est inactif (cas n° 1).

Dans un cas de dysenterie amibienne chronique, il se servit non pas d'un « antigène mucus » préparé à partir des selles du malade, mais l'antigène précédent et il eut encore des résultats postitifs (cas n° 4).

Ces cas assez nets ne permettent pas à Scalas de conclure d'une manière définitive, mais on pouvait penser « à l'existence d'anticorps spécifiques dans l'amibiase et espérer un moyen de diagnostic différentiel entre la dysenterie amibienne et la dysenterie bacillaire.

La méthode des cultures, en donnant aux chercheurs la possibilité d'avoir un matériel abondant d'amibes vivantes, donna lieu à de nouvelles recherches de la part de Ch.-F. Craig. Il se sert comme antigène d'extraits alcooliques de culture d'*E. histolytica* ; les propriétés cytolytiques et hémolytiques des extraits se révélant dans l'alcool absolu et non dans l'eau salée.

Craig cultive des souches d'*E. histolytica* sur milieu (L. E. S., Locke, œuf, sérum) de Boeck et Drbolav et sur un milieu inventé par lui (Locke-sérum).

Technique. — Le contenu de 60 tubes de culture après 48 heures est centrifugé ; le liquide surnageant rejeté, on ajoute alors 10 volumes d'alcool absolu. Cette solution, mise à l'étuve à 37° pendant 10 jours et remuée fréquemment, est filtrée au bout de ce temps-là. On se sert du filtrat pour les diverses expériences.

On prépare ainsi une série de 7 extraits, soit avec de l'alcool à 50°, soit avec des solutions d'eau salée.

Ext. n° 1. — L. E. S. et alcool absolu.
Ext. n° 2. — Identique.
Ext. n° 3. — L. E. S. et alcool à 50°.
Ext. n° 4. — Locke-sérum et alcool absolu.
Ext. n° 5. — Culture de 7 jours sur Locke-sérum et alcool absolu.
Ext. n° 6. — Culture de 7 jours sur Locke-sérum et alcool à 50 %.
Ext. n° 7. — L. E. S. et solution salée normale, mis en contact pendant 24 heures.

Des extraits microbiens, préparés selon la même technique à partir des bactéries accompagnant les cultures ; (bactéries isolées et cultivées pendant 40 heures sur milieu Locke-œuf-sérum.) Ils serviront de tests de contrôle, pour discriminer les résultats dus aux microbes accompagnants ou aux amibes spécifiques.

Un autre test de contrôle fut préparé avec du streptocoque hémolytique, pour juger ainsi le rôle possible joué par ce microbe dans les phénomènes d'hémolyse des extraits microbiens.

Les propriétés hémolytiques des extraits.

On les mit en évidence en ajoutant des quantités convenables d'extraits aux tubes contenant 0,9 cc. de solution salée normale et 0,1 cc. d'une suspension de globules rou-

ges humains, l'ensemble étant mis à l'étuve pendant deux heures.

Il y eut hémolyse à partir des tubes contenant :

0,02 cc. d'extrait 1 et 4 ;
0,03 cc. d'extraits 2 et 3 ;
0,07 cc. d'extraits 5.

Aucune hémolyse avec les extraits 6 et 7.

On fit les mêmes expériences avec les extraits bactériens.

Hémolyse avec 0,07 d'extraits, avec l'alcool absolu.

Hémolyse avec 0,07, avec l'alcool à 50 %.

Hémolyse avec 0,09, avec une culture de streptocoque hémolytique.

Hémolyse avec 0,07.

Il semble bien en effet que l'hémolyse produite dans les tubes contenant moins de 0,07 soit due à la substance hémolytique des extraits amibiens et non à l'alcool, ou aux bactéries.

Spécificité de cette hémolysine.

Cette hémolysine n'est pas spécifique pour les globules rouges humains ; elle hémolyse aussi les globules rouges de lapin et de cobaye.

Résistance à la chaleur.

Dilués dans d'égales quantités d'eau salée, les extraits sont chauffés pendant une heure à 60°, 70°, 80°.

La substance hémolytique est détruite quand elle est exposée à la température de 80° pendant une heure et atteinte par un chauffage d'une heure à 70°.

Origine de cette hémolysine.

Le liquide surnageant des cultures de 40 heures et d'une semaine, étudié dans les mêmes conditions, ne montra

aucune propriété hémolytique ; de même le filtrat des cultures de bactéries accompagnant les cultures.

Il semble donc que la substance hémolytique soit intimement associée aux amibes, et aux amibes vivantes ; les cultures âgées ou complètement dégénérées ne donnant aucun résultat.

Détermination des propriétés cytolytiques de ces extraits.

La muqueuse du côlon ascendant et du rectum d'un chat sacrifié est râclée et les produits de râclage placés dans une solution salée normale. On ajoute un dixième de cette suspension de cellules épithéliales en solution saline normale et des quantités croissantes d'extraits alcooliques 0,01, 0,02, etc...

Après deux heures de chauffage au bain-marie à 40°, on examine le sédiment macro et microscopiquement pour étudier l'action des extraits sur l'épithélium.

Il y a disparition complète des cellules épithéliales dans les tubes contenant 0,04, 0,05 d'extraits : les quantités plus faibles ne détruisant qu'un partie des cellules ; les quantités plus fortes n'ayant aucune action cytolytique ; il y aurait pour Craig une action préservatrice de l'alcool dans les tubes contenant beaucoup d'extraits.

Détermination des propriétés bactériolytiques.

On étudie cette action sur des solutions de bactérium coli (0,1) dans des solutions salées normales (0,9) auxquelles on ajoute des quantités croissantes d'*E. histolytica* de 0,01 à 0,1. Après deux heures de chauffage au bain-marie à 37°, on met une petite quantité de ces solutions dans des boîtes de gélose lactosée ensemencée avec 0,1 du mélange bactéries et extraits.

Le résultat fut négatif ; il n'y eut aucun arrêt de développement dans les colonies bactériennes par rapport aux cultures de contrôle.

Ces substances hémolytiques et cytolytiques mises en évidence dans ces extraits alcooliques d'*E. histolytica* en cultures sont pour Craig semblables aux substances solubles dans l'alcool et extraites des cultures de mycobactérium tuberculosi du même auteur, de Dienes et Scheff, de Lewis, ou de *treponema pallidum* de Craig, Nichols, ou de cercaires de bilharzies de Fairley.

La mise en évidence d'une substance hémolytique expliquant par Craig l'action locale d'*E. histolytica*, et les lésions intestinales de la maladie.

D'après cet auteur, l'absence de bactériolysine indiquerait que les amibes vivantes n'ingèrent pas de bactéries en cultures, mais seuls les individus dégénérés en contiendraient à l'intérieur de leur propoplasma. Cette opinion ne nous semble pas assez nettement démontrée, de nombreuses études morphologiques précises ayant donné des résultats contraires.

Cette mise en évidence dans les cultures d'amibes dysentériques de substances susceptibles de donner un diagnostic de l'amibiase par l'étude de la fixation du complément a permis à Craig d'étudier cette nouvelle méthode.

Il se servit de la technique de la réaction de Border-Wassermann en usage dans le service de santé militaire des Etats-Unis.

Les extraits furent employés, sans dilution (le pouvoir antigène étant assez faible), à des doses de 0,7 à 0,10 cc. La première étude de Craig porta sur 300 sérums de malades divers.

Sur ces 300 malades, 225 furent examinés en même temps au point de vue parasitisme intestinal (examen direct et cultures). Sur ces 225 cas, 26, soit 11,5 %, eurent un test de fixation du complément positif et 199 un test négatif : Craig divise les résultats en :

Hémolyse absolue : + +
Hémolyse partielle (50 %) : +

Hémolyse partielle (moins de 50 %) : +
0 hémolyse.

D'après la notation de Craig, il y eut :

26 cas positifs : 24 + +
2 +.

Sur ces 26 cas, 24 étaient infectés par *E. histolytica ;* les deux cas ne montrèrent la présence d'aucun parasite malgré les examens copologiques et de culture ; dans les 199 cas ne donnant aucun test positif, 2 se montrèrent porteurs d'*E. histolytica.*

Dans les infections à autres parasites, il y eut :

28 cas d'infection par *E. coli;*
18 cas par *Entamoeba nana;*
2 cas par *Iodamoeba Williansi ;*
8 cas par *Chilomastix Mesnili;*
6 cas par *Trichomonas Hominis.*

Le test de Craig ne fut positif que dans 2 cas d'infection à *E. coli.*

Dans les infection, des malades ayant un test positif étaient porteurs :

5 d'*E. coli* et *E. histolytica;*
2 d'*E. histolytica* et *E. nana.*

Les relations de ce test et des réactions de Bordet-Wassermann ; un seul des malades ayant un test positif donna une réaction de Kahn faible.

Parmi les 199 cas négatifs, 7 donnèrent une réaction B.-W. positive et 10 eurent une réaction de Kahn fortement postive (+ + + +).

Il était surtout intéressant de noter qu'à l'exception de 5 cas, Craig ne connaissait pas les diagnostics cliniques des gens examinés, et dans de nombreux cas, le résultat positif fut la première indication d'une infection possible par *E. histolytica.*

Les examens ultérieurs des selles et les cultures montrèrent ensuite la réalité de cette infection. Le traitement ordinaire de l'amibiase fit disparaître ces états de troubles gastro-intestinaux avec diarrhée chronique ou aiguë.

Le test de Craig devint négatif après le traitement.

Par Craig, il est intéressant de remarquer aussi qu'il n'est point besoin d'une infection massive pour donner un test franchement positif. Dans plusieurs cas, à des hémolyses complètes correspondaient des signes de dysenterie chronique légers.

Mais, dès ce moment, l'auteur ne cache pas la difficulté d'une telle réaction, la possibilité d'erreur de technique et surtout la nécessité de nouvelles expériences portant sur un grand nombre d'individus pour mieux juger la méthode.

C'est à cela qu'il va travailler pendant les années qui vont suivre.

En 1929, Craig publie une nouvelle statistique portant sur 623 individus ; il étudie leurs selles selon les méthodes coprologiques habituelles, les cultive sur les milieux usuels et recherche son test de fixation du complément dans leur sérum.

Sur 623 sérums examinés, 67 donnent un résultat nettement positif (+++) ; l'examen coprologique et les cultures avaient mis en évidence l'infection par *E. histolytica* de 61 de ces malades.

Parmi les 556 individus dont le sérum ne donnait aucun résultat, 5 étaient porteurs d'*Ent. histolytica,* l'un de formes végétatives s'accompagnant de dysenterie aiguë, l'autre avait un abcès du foie, les trois derniers étant des « porteurs de kystes » sains.

En 1930, il publie une statistique d'ensemble réunissant tous les cas examinés jusqu'à cette date; 689 ont été étudiés et 84 donnent une réaction positive avec sa méthode de fixation du complément.

71 donnent une réaction très nette (++++) ;

13 donnent une réaction nette (+++).

Les méthodes coprologiques montrèrent que 77 d'entre eux étaient infectés par *E. histolytica*.

Parmi les 605 dont les sérums ne donnaient aucune réaction avec l'antigène alcoolique, 5 étaient porteurs de formes végétatives ou de formes enkystées d'amibes dysentériques ; 59 étaient infectés par d'autres amibes et leurs sérums se montrèrent négatifs.

Malgré ces résultats dans l'ensemble satisfaisants, Craig insiste sur la difficulté technique d'une telle méthode de diagnostic, l'antigène étant de préparation délicate et possédant un faible pouvoir antigénique. Ces réactions d'un intérêt évident nécessitant des protozoologistes et des sérologistes compétents.

Deux ans plus tard, Craig publie un travail portant sur l'amibiase expérimentale du chien et les réactions de déviation du complément.

Faust avait montré que le chien est infecté par *E. histolytica* et que les lésions intestinales trouvées chez lui sont comparables à celles de l'homme.

Craig étudia sa réaction chez 29 chiens infectés expérimentalement par *E. histolytica;* 28 donnèrent une réaction positive ; l'analyse de leurs déjections permit de déceler *E. histolytica* chez 28 d'entre eux ; 22 moururent quelque temps après ayant des ulcérations du côlon typique.

La réaction de fixation du complément devint positive de 3 à 14 jours après l'inoculation.

Craig examina alors le sérum de 42 chiens dont les déjections s'étaient toujours montrées indemnes de toute infection par *E. histolytica* et eut des résultats toujours négatifs.

Il reprend l'étude de l'amibiase expérimentale du chien avec Kagy en 1933 et voit la réaction de fixation du complément positive au début devenir négative après le traitement à l'émetine de l'amibiase des chiens infectés.

Il constatera ce phénomène chez l'homme dans des cas d'amibiase chronique. La réaction de déviation du complément, négative après le traitement, reste négative pendant

la convalescence et la guérison apparente du malade et devient positive lors d'une rechute avant même qu'*Entamoeba histolytica* ait été décelé dans les fèces.

La réaction redeviendra négative de 3 à 28 jours après la disparition d'*E. histolytica* dans les selles sous l'influence du traitement.

La réaction se montrerait positive dans des cas d'hépatite amibienne ou d'abcès du foie ne s'accompagnant d'aucun symptôme intestinal, et elle serait plus nette dans les cas de dysenterie subaiguë ou chez les porteurs de kystes que chez les malades en épisodes aigus où Craig a constaté souvent des réactions négatives.

Kieffer se servit de ce moyen de diagnostic pour étudier 19 cas de colites chroniques. Dans 15 cas, l'auteur observa une réaction de Craig nettement positive ; ce résultat ne permet pas à celui qui l'a obtenu de conclure nettement.

Sherwood et Heathman étudièrent la méthode de Craig en se servant d'antigènes lipoïdiques. Menendez en 1932 étudia la déviation du complément chez des lapins inoculés avec des cultures d'*Entamoeba histolytica* obtenues sur milieux de Tanabe et Chiba. Il obtient des résultats nets de déviation du complément trois mois après la dernière inoculation.

Les essais de diagnostic de l'amibiase par les intra-dermo. Réactions.

Parallèlement à ces essais de mise en évidence de déviation du complément, d'autres auteurs ont essayé de mettre en évidence des réactions de sensibilisation de l'organisme en employant les méthodes intra-dermo-réactions.

En 1922, deux ans après son essai de diagnostic de l'amibiare par l'étude de la déviation du complément, Scalas essayait la méthode des intra-dermo réactions en se servant comme antigène préparé de la façon suivante :

« 30 grammes de mucus intestinal fraîchement émis sont

mis dans un flacon contenant 50 cm³ de solution physiologique ; après avoir agité fortement, le tout est mis à l'étuve à 37° pendant une semaine. Au bout de ce temps-là on filtre sur bougies Berkefeld ; le filtrat décoloré par passage à travers du charbon animal est stérilisé par chauffage discontinu dans un récipient stérile. »

On emploie la technique de la Réaction de Casoni, c'est-à-dire injection dermique d'un quart de centimètre cube de l'antigène ainsi préparé. L'injection se fait au bras ou à l'avant-bras ; une épreuve de contrôle est faite en injectant $\frac{1}{4}$ de centimètre cube d'une solution de chlorure de Na à 0,85 %.

On examine alors d'heure en heure le point injecté et si la réaction est positive, on voit apparaître un œdème rosé, puis une sorte de bulle, le tout ayant 5 à 6 cm. de diamètre.

Cette inflammation disparaît au bout de 3 jours sans laisser de traces ; on peut observer quelques cas de lymphangite qui guérissent rapidement.

Scalas étudia ainsi neuf cas de dysenterie amibienne aiguë chronique ou subaiguë, avec présence d'amibes ou de kystes dans les selles.

Il eût neuf réactions positives, très nettes chez les malades en épisode aigu, plus atténuées chez les dysentériques chroniques. Il contrôla la valeur spécifique de sa réaction en l'étudiant chez des malades atteints d'affections diverses cardiaques, pulmonaires, etc... Il eut toujours des résultats négatifs.

Cette méthode diagnostique fut étudiée à nouveau par Tripoli en 1929 ; celui-ci se servit d'extraits glycérinés de culture d'amibes obtenus en ajoutant au sédiment d'une culture un égal volume de glycérine.

Après trois jours d'étuve à 37° on centrifuge de nouveau, mais à faible vitesse ; on enlève le liquide surnageant dont on vérifie la stérilité en l'ensemençant sur bouillon. Cet extrait glycériné stérile est injecté dans le derme (à la dose de 0 cm³, 2) de malades infectés par *E. hystolytica*.

Ce test se montra positif en donnant une réaction locale caractérisée par une inflammation et une rougeur de 1 cm. de diamètre.

Le test fut ainsi recherché chez des malades divers, ou chez des malades soupçonnés d'amibiare sans preuves copologiques. Il y eut des résultats divers négatifs, douteux et même positifs, empêchant, ne permettant pas à l'auteur de conclure d'une façon précise à la spécificité de l'antigène ainsi préparé.

Miss Spector, en 1933, essaiera à son tour la méthode des intra-dermo-réactions pour le diagnostic de l'amibiase ; mais constatant des réactions nettes dans des cas d'helmithiare avec les antigènes amibiens, elle ne pourra conclure à la spécificité d'un telle réaction.

Mais, dans ce domaine, tous ces essais sont imparfaits et les résultats sujets à caution, bien que Craig semble avoir apporté dans ses statistiques des faits assez probants.

Il faut attendre d'autres vérifications et surtout l'avènement de la « culture pure » qui permettra d'employer des antigènes amibiens et non des complexes amibes-microbes d'une valeur scientifique douteuse.

Si nous essayons d'appliquer à l'amibiase les acquisitions nouvelles apportées par la méthode des cultures à la connaissance de l'agent causal de cette infection, nous voyons:

1° Qu'au point de vue épidémiologique la notion de résistance des formes végétatives aux variations de température et la possibilité qu'ont ces formes végétatives de cultiver et de se multiplier dans des eaux souillées (eaux d'égouts), comme vient de le montrer R. Deschiens, permet d'imaginer une possibilité de dissémination et de transport du parasite à l'état vivant et non plus seulement sous sa forme enkystée, ainsi qu'on l'admet actuellement.

2° Au point pathogénie, l'étude de la variabilité du pouvoir infectant « in vitro » d'une même souche d'*E. histolytica* semblerait confirmer la théorie que certains auteurs (Mathis, Wenyon) avaient émise : l'*Entamoeba histolytica* est normalement un parasite inoffensif, comme toutes les amibes intestinales de l'homme ; elle se trouverait dans l'intestin sous la forme « minuta », non hematophage, ne produisant aucun trouble pathologique; la transformation en *E. histolytica* ou en tissu invading forms de de Wenyon se faisant dans des conditions mal déterminées (milieu intestinal, flore microbienne défavorable).

Mais il semble que ce sont les variations de la réceptivité des hôtes pour une même souche d'*E. histolytica* qui doivent expliquer ces phases d'inocuité ou de manifestations pathologiques dans l'amibiase. Les effets produits différant totalement chez des gens d'une même espèce inoculés avec la même souche d'*E. histolytica* en cultures. On peut, en effet, observer après inoculation :

1) absence de transmission,
2) infection sans action pathogène,
3) infection avec dysenterie.

Cette dernière façon de voir n'est-elle pas en accord avec les expériences de Sellards, de 1913, où vingt individus infectés avec des kystes d'une même souche d'*E. histolytica* réagissent différemment : 18 devinrent infectés ; 4 eurent des accès de dysenterie plus ou moins aigus à des moments plus ou moins éloignés ; 14 enfin devinrent « porteurs de kystes » d'emblée ; ces kystes émis dans leurs selles donnant à un autre individu une dysenterie typique.

Deux interprétations de ces discordances sont ici en présence.

1. Il s'agit d'espèces pathogènes et d'espèces non pathogène [Hartmann, Brumpt (*E. dispar.*)]

2° Il s'agissait de variations dans la réceptivité des individus, variations non seulement individuelles, mais variations dans le temps pour un même individu.

Peut-on alors devant le comportement si différent des individus devant des souches identiques d'*E. histolytica* parler d'immunité — « immunité naturelle ou immunité acquise —, comme J. Gordon-Thomson, ou de prémunition, selon le terme employé par Ed. Sergent dans le paludisme et sans doute applicable aux autres protoozes ?

Immunité ou simple prémunition: combien incertaines et si admises, sans aucune preuve d'ailleurs, combien fragiles ! — pas plus que son existence clinique son identité biologique ne peut être reconnue. Anticorps n'est pas test d'immunité ; or ces anticorps eux-mêmes sont incertains ; les réactions de Craig (fixation du complément par antigènes alcooliques de culture d'*E. histolytica*) indice possible d'une certaine sensibilisation de l'organisme — malgré les conditions défavorables dans lesquelles ces réactions sont pratiquées (souillures microbiennes) — soint loin d'en démontrer l'existence authentique.

Peut-être est-il plus vraisemblable de faire intervenir des conditions de réceptivité des individus, variables d'un conditions de réceptivité des individus variables d'un moment à l'autre, dont certaines sont connues en pratique cli-

nique pour provoquer les accès dysentériques chez les infectés. Aussi dans l'opinion actuelle des choses ne peut-on que se ranger à l'opinion de M. Dobell (lettre personnelle du 6 décembre 1934).

« It is impossible to distinguish strains of *E. histolytica* as « pathogenic » and « non-pathogenic » to all host and at all times : still less, therefore can it be possible to distinguish a « pathogenic » and a « non pathogenic » species of such amoebae...

It is at present only possible to say of any strain that it is « pathogenic » for particular individuals of particular species under particular conditions ».

(Il est impossible de distinguer des souches d'*E. histolytica* en souches pathogènes et non pathogène pour tous les hôtes, et à n'importe quel moment ; encore moins de distinguer une espèce pathogène et une espèce non-pathogène de cette amibe.

On peut seulement dire actuellement que n'importe quelle souche est pathogène pour des individus particuliers, d'espèces particulières dans des conditions particulières).

CONCLUSIONS

La culture d'*Entamœba histolytica* obtenue pour la première fois de façon certaine par Boeck et Drbohlav, est basée sur les principes généraux fixés par ces auteurs.

Emploi d'un milieu mi-solide, mi-liquide avec un p H de départ de 7,2, mis à l'étuve à 37°.

Les modifications et améliorations apportées à cette méthode permettent de cultiver facilement « Entamœba Histolytica ». Parmi celles que nous avons éprouvées, nous avons retenu et utilisons couramment le procédé de Dobell et Brumpt caractérisé par l'addition d'amidon, de riz qui enrichit les cultures et provoque les enkystements ultérieurs.

La possibilité de cultiver « *Entamœba hystolytica* » et de disposer d'un matériel amibien vivant, a permis de mieux connaître certains détails de sa morphologie, de fixer grâce surtout à Dobell, son cycle évolutif complet son mode de dékystement et de multiplication.

Appliquée au diagnostic de la maladie, la méthode des cultures apparaît comme un moyen d'enrichissement. Mais ses résultats à peine supérieurs à ceux obtenus avec les procédés d'enrichissement courants et sa moindre simplicité ne fait pas encore des cultures, un procédé de diagnostic en dehors des laboratoires spécialisés.

De nombreux essais de diagnostic biologique (méthode de fixation du complément, intra-dermo-réaction) ont été faits en se servant d'antigène (extraits alcooliques de cul-

ture). Les résultats paraissent encore incertains. Il faut attendre d'autres confirmations et surtout la possibilité d'obtenir des cultures d'*E. histolytica* sans flore microbienne ou « culture pure » pour confirmer la valeur de ces méthodes.

Vu ;
Le Doyen,
Pierre MAURIAC

Vu, bon à imprimer,
Le Président,
H. BONNIN

Vu et permis d'imprimer ;
Bordeaux, le 7 décembre 1934
Le Recteur de l'Académie
A. TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

Andrews. — « The cultivation of E. histolytica by Bœck's method », *Amer. jourh. of Hygien*, v. 1925, p. 556.

Andrews, **Johnson** and **Schawartz**. — « The use of fecal extracts in the cultivation of E. histolytica », *Tropical Diseases Bulletin*, 1934, p. 283.

Arndt. — « Zur technik der a mobon zuchtung », *Centralblag f. bacteriol. (orig.)*, LXXXVIII, 1922, f. 417.

Barret (H.) et **Smith** (A.). — « The cultivation of E. ranarum », *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, XX, 1926, p. 85. *American journ. of hygien*, IV, 1924, p. 155-168.

Bidegarray (H.). — *Etude statistique et critique du parasitimse intestinal*, thèse, Paris, 1927, *C. R. Soc. Biologie*, 1929, C. p. 169-270.

Bishop. — « Experiments on the action of Emetine in cultures of Entamœba Coli », *Parasitology*, 1929, vol. 21, n° 4, p. 481-486.

Boeck et **Drbohlav**. — « The cultivation of Entamœba hystolitica », *American journal of Hygien*, V, 1925, p. 371.

— « The cultivation of Entamœba histolytica », *Proceedings Nation. Academ. Sciences*, II, 1925, p. 235 et 727.

Brug. — « Observations on a culture of E. histolytica », *Med. van der Dieuts. der Volk. in Ned. India*, 1928, vol. 17, p. 225, 233.

Brumpt (E.). — « L E. Coli peut-elle être pathogène pour l'homme. Expérimentaement elle peut l'être pour le chat », *Bull. Acad. méd. Paris*, XCV, 16 mars 1926.

— « L'infection expérimentale du chat par l'E. coli », *Annales de Parasitologie*, IV, 1926, p. 279, note 2.

— « Quelques faits nouveaux concernant les amibes intestinales de l'homme et leur culture «, *Bulletin médical*, janvier 1926, vol. 40, n° 5, p. 105-109.

Callot (J.). — *Réactions d'hyper-sensibilité cutanée et diagnostic des maladies parasitaires*, Vigot, 1934.

Casagrandi et **Barbagallo**. « Recherche biologiche et clinique sull' amœba Coli (Losch) (nota preliminare) », *Bull. Academia gioenia Sc. Nat. Catania*, fasc. XXXIX (N. S.), p. 4, 1894.

— *Ibid* (2da nota preliminare), fasc. XLI, N. S., p. 7, 1895.

— « Entamœba hominis Amoba Coli (Losch). Studio biologico e clinico », *Ann. d'Igien sperimentale*, t. VII, 103, 1897.

— « Ueber die kultur von Amoben », *Centralbl. fur Backt.* (I Abt. original), XXXVIII, 66, 1897.

Carvallo. — Thèse Paris, 1926.

Celli et **Fiocca**. — « Beitrage zur Amoben forschung », *I. Centralbl. fur Bakt.*, XV, p. 470, 1894.

— « Ueber die Klassification der Amoben und einige gezuchtete Species », *Ibid.*, XVI (I Abt.), p. 329, 1894)

— « Ueber die Aetiologie der Dysenterie », *Ibid.*, XVII (I. Abt.), p. 309, 1895.

Chatton (E.). — « L'éclosion des kystes et le premier stade de l'évolution de l'amibe dysenterique humaine chez le chat », *Bull. Soc. Path. exotique*, 1917, p. 834.

Chatton et **Lelung-Bonnaire**. — « Amibe limax (Walkampfia n. gen.) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture », *Bull. Soc. Path. Exotique*, 1912, t. V, p. 135, 143.

Chiang. — « The rat as a possible carrier of dysentery amœba », *Proceedings National Academy of Sciences*, 1925, tome XI, p. 239.

Chiba. — « On the cultivation of E. hystolytica and studies of certain drugs upon E. histolytica in cultures », *Journal of the Chosen Medical Association*, 1928, p. 751-753.

Chiba et **Kuwabara**. — « On the pathogenicity of E. histolytica cultivated in Tanabe and Chiba's medium », *Keijo. Med. journ.*, I, p. 94, 1930.

Cleveland et **Collier**. — *American journal of hygien*, t. XII, 1930, p. 611, 612.

Cleveland et **Sanders**. — « The virulence of a pure line and several strains of E. histolytica for the liver of cats and the relation of bacterial cultivation and liver passage to virulence », *American journal of hygien*, 12 nov. 1930, vol. 12, n° 3, p. 569-605, *Americ. journ. of hyg.*, XII, 1930, p. 611-612.

Couret et **Walker** (James). — « The cultivation of Amœbae in pure cultures upon autoltzect tissues », *Journal of Experimental Medecine*, 1913, t. XVIII, p. 252.

Craig (Ch. F.). — « The parasitic amœba of man and their relation to disease », *New Orleans Med. and Surgery*, LXV, 1912, p. 117.

— « The relation of parasitic amœba to disease », *Amer. journ. of med. sciences*, XLV, 1913, p. 83.

— « The relation of parasitic amœba to disease », *War Dep. office of the Surgeon general Bull.*, 1913, p. 95.

— « A simplified method for the cultivation of E. histolytica », *Amer. journ. Trop. Medecine*, VI, 1926, p. 333.

— « Observation upon the cultivation of E. histolitytica », *Americ. H, Trop. Medecine*, VI, 1926, p. 461.

— « Observations upon the hemolytic, cytolytic and complement binding properties of extracts of E. histolytica », *Amer. journal of trop. Med.*, VII, 1927, p. 39.

— « Complement fixation in the diagnosis of infections with E. histolytica », *Amer. journal of Trop. med.*, VIII, janv. 1928, p. 29-36.
— « Symptomatology diagnosis and treatment of carriers of E histolytica », *Journ. Amer. med. Association*, 28 avril 1928, vol. 90, n° 17, p. 1345-1349.
— « Observations upon complement fixation in infections with E. histolytica », *Proc. Nat. Acad. Sc.*, juillet 1928, vol. 14, n° 7, p. 520-526.
— « The technique and results of a complement fixation test for. the diagnosis of infections with E. histolytica », *Amer. Journ. of Trop. med.*, sept. 1929, vol. 9, n° 5, p. 277-296.
— « The diagnostic value of the complement fixation test in Amœbic infections », *Journ. Amer. Med. Association*, 5 juillet 1930. vol. 95, n° 1, p. 10-13.
— « Observations on the use of Kendall's medium in the cultivation of E. histolytica », *Proc. Soc. Zxper. Biol. and Med.*, féb. 1932, vol. 29, n° 5, p. 663.
— « Observations upon complement fixation in experimental Amœbiasis in dogs », *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, déc. 1932, vol. 30, n° 3, p. 280-272.
— « A study of complement fixation in experimental amœbiasis in dogs », *Amer. journ. of Hygien*, juillet 1932, vol. 18, n° 1, p. 202-219.
— « Further observations upon te complement fixation test in the diagnosis of amoebiasis. An analysis of the results of the tests in the thousand individuals », *Journ. Labor. and clinical med.*, juin 1933, vol. 18, n° 9, p. 873-881.
Craig et **Kagy**. — « Complement fixation test in Amoebiasis », *Amer. journ. of hygien*, juillet 1933, vol. 18, n° 1, p. 202-219.
Craig (Ch.) et **St-John**. — « The value of cultural methods on surveys for parasitic amœbae of man », *American journ. of Tropical medecine*, t. VII, p. 39-1927.
Cutler. — « A method for the cultivation of E. histolytica », *Journal of Pathology and Bacteriology*, t. XXII, p. 27, 1918.
— « Observations on E. histolytica », *Parasitology*, t. II, p. 127-1919.
Darling (S.). — « The observations of the cysts of E. tetragena », *Ann. of Int. med.*, II, 1913, p. 1.
Daspect et **Jonchere**. — « Action de l'hémoglobine sur les cultures d'entamœba dysenteriae », *Bul. Soc. Path. Exotique*, 11 oct. 1933, p. 995.
Dean et **Monat**. — *Journ. Royal Army Med. Corps*, XXVI, 1916, p. 183.
Deschiens (R.). — « Recherches sur les cultures d'E. dysenteriae. Modifications du milieu et de la technique Bœck Drbohlav », *C. R. Soc. Biologie*, XCVI, 1927, p. 1356.

— « Recherches sur la culture d'E. dysenteriae, évolution chimique, simplification », *C. R. Soc. Biol.*, 20 juin 1929, vol. 101, nº 22., p. 665-667.

— « Indications pratiques sur le transport des formes végétatives d'amibes dysentériques », *Bull. Soc. Path. Exotique*, mars 1932 p. 207.

— « Influences des hématies et de l'hémoglobine des mammifères sur les cultures d'amibes dysentériques », *Bull. Soc. Path. Exotique*, 11 oct. 1933, p. 999.

— « Culture, enkystement de l'amibe dysentérique dans les eaux d'égouts », *C. R. Soc. Biol.*, nº 7, 1934, t. CXV, p. 793.

— « Méthode de culture à des températures alternées de l'amibe dysentérique », *C. R. Soc. Biol.*, nº 10, 1934.

Deschiens et **Kipchidze**. — « Cultures d'entamoeba dysenteriae sur un milieu de culture à base de gélose de Nusgrave », *C. R. Soc. Biol.*, 1930, 31 janv., vol. 103, nº 4, p. 226-228.

Dhayagude. — « Culture de l'entamœba dysenteriae sur milieux à l'intestin de chat », *Ann. Paras. humaine et comparée*, nov. 1932, vol. 10, nº 6, p. 514-519.

Dobell (C.). — *The amœbae living in man. A zoological monograph*, London, 1919.

— 1927. « Further observations and experiments on the cultivation of Entamœba histolytica from cysts », *Parasitology*, t. XIX, p. 288.

— (1928). « Researches on the Intestinal Protozoa of Monkeys and man. I. General introduction, II. Description of the whole history of Entamœba in cultures », *Parasitology*, t. XX, p. 357.

Dobell and **Bishop** (A.) (1929). — *Idem*, III, the action of Emetine on natural amœbic infectious in macaques », *Parasitology*, t. XXI, p. 446.

— (1931) *Idem*, IV. « An experimental study of the histolytica-like species of Entamœba living naturally in macaques », *Parasitology*, t. XXIII, p. 1.

Dobell (C.) and **Laidlaw** (1926). — « The action of ipecacuanha alkaloids on Entamœba histolytica and some other entozoic amœbae in culture », *Parasitology*, 18, 206.

— (1926) « On the cultivation of Entamœba histolytica and some other entozoic amœbae », *Parasitology*, 18, 283.

Dobell (C.) and **O'Connor** (F. W.) (1921). — *The Intestinal Protozoa of Man*, 8º, London.

Dobell (C.) and **Dale**. — « Experiments on the Therapeutics of Amœbae dysentery », *Journal Pharmacol. and experiment. therapeutic*, 1917, p. 339.

Drbohlav (I.). — « Demonstrations and explications of the method for cultuvation of Entamœba histolytica », *Trans. of the R. Soc. of Trop. Med. and Hygiene*, XVII, 1924, p. 238.

— « Présentations d'amibes dysentériques en cultures », *Bull. Soc. Path. Exotique*, XVII, 1925, p. 121.

— « Une nouvelle preuve de la possibilité de cultiver Entamœba dysenteriae type histolytica », *Ann. de Parasitologie*, III, 1925, p. 349.

Forster et **Johns** (M.). — *Southern medical journal*, mars 1930, vol. XXIII, n° 3, p. 236-237.

Freeman. — « Etude sur les amibes des êtres humains », *Journal Parasit.*, sept. 1929, vol. XVI, n° 1, p. 1 et p. 12.

Friedrichs et **Harris**. — « Cultivation of Entamœba histolytica from an hepatic amoebic abcen », *Soc. Exper. Biol. et Med.*, 1929, nov. vol. XXVII, n° 2, p. 90-91.

Frye et **Meleney**. — *Studies on E. Histolyrica and others intestinal protozoa in Tennessee.*

— « The influence of the bacterial flora in culture of Entamœba histolytica on the pathogenicity of the amœba », *American Journal of hygien*, nov. 1933, vol. 18, n° 3, pp. 543.

Gauducheau (A.). — Sur une culture amibienne, *Bull. Soc. Path. Exotique*, II, p. 247, 370, 568, 1908.

— Etude comparative d'une amibe de culture et de quelques autres formes amibiennes végétatives, *Bull. Soc. Méd. Chir. de l'Indo-Chine*, t. V, p. 293, 1914.

Gemaar. — « Effects of bacteriophage upon cultures of Entamœba histolytica », *Proc. Soc. Exper. Biol. et Med.*, nov. 1929, vol. 27 n° 2, pp. 95-97.

Gordon-Thomson (J.). — The question of immunity in mon to protozoological Diseases. *Proc. Roy. Soc. Méd.*, t. XXV, p. 924, 1931.

Gridewa (W. B.). — « Influence de la concentration en sel sur la croissance et la morphologie des amibes en culture », *Nachrichten A. Tropischen Medizin*, janvier 1929, vol. 2, n° 1.

Guérin et **Pons**. — « Culture d'Entamœba dysenteriae » in *Bull. Soc. Med. Chir. de l'Indo-Chine*, mai 1925.

— « Culture de Pastocystis hominis et de protozoaires intestinaux chez l'homme », *Ann. I. P. de l'Indochine*, 1926, p. 213.

— « Cultures de trichomonas hominis », *Bull. Soc. Med. et Chir. de l'Indochine*, août 1925.

— « Culture de l'Entamœba dysenteriae sur le milieu de Boeck et Drbohlav modifié », *Bull. Soc. Path. exotique*, juillet 1925.

Gupta (B.). — « A note of the cultivation of Entamœba from a monkey », *Indian Med. Gazette*, LX, 1925, p. 323.

Halawani. — « Experimental study on the resistance of Entamœba histolytica to Emetine hydrochloricte in vitro », *Ann. Tropical Med. et Parasit.*, 8 juillet 1930, bol. XXIV, n° 2, p. 273.

Harris et **Friedrichs**. — « Injections to a rabbit of cultures of entamœba histolytica », *Pro. Soc. Experiment. Biol. et Med.* nov. 1929, vlo. XXVII, n° 2, p. 91.

Izar. — *Annali di clinica medica*, anno V, fasc. II, et III, 15 mai, 1914.

Kessel. — « Amebiasis in kittens infected with amœbae from acute and « carrier » human cases, and with the tetranucleate amœbae of the monkey and of the pig », *American Journal of Hygien*, 8, p. 311, 1928.

Kieffer. — « The Craig complement fixation test for Amœbiasis in chronic ulcerative colitis », *Amer. journal of the medical sciences*, mai 1932, vol. 183, n° 5, p. 624-641.

Kofoid et **Allen.** — « On the culture in vitro of Concilmania lafleuri and Entamœba coli », *Proc. Soc. for Experiment. Biolo and med.*, XXIII, 1924, p. 300.

Kofoid et **Wagener.** — « Studies on the aspect of certain drug upon Entamœba dysenteriae in vitro », *Univ. California Public Zool.*, XXVIII, 1925, p. 155.

— « The behaviour of E. dysenteriae in mixed cultures with Bacteria and studies of the effect of certain drug upon E. dysenteriae in vitro », *Univ. Calif. Public. Zool.*, XXVII, 1925, p. 127.

— « A simplified method for the cultivation of E. dysenteriae », *Journal Labor. and Clin. med.*, XI, 1926, p. 683.

Kovacs. — « Beobachtungen und Versuche uber die sogenante amoben dysenterie », *Zeitschrift Heipkde*, XIII, p. 509, 1892.

Kuwabara. — I. « The cultivation of E. histolytica by Tanabe and Chiba's methods », *Tokio Iji Shinshi* (*Japanese*), n° 2618, 1929.

— II. « Observations on cultural forms of E. histolytica, in special references to its encystation and excystation », *Journal of the Chosen Association* vol. 19, 1929.

Laidlaw (P.), **Dobell** (C.) et **Bishop** (A.). — « Further experiments on the action of emetine in culture of histolytica », *Parasitolog*, XX, 1928, p. 207.

Langeron. — *Précis de microscopie*, Paris, Masson, 4e édition 1925, 5e édition, 1933.

Le Bourdelles, Liégeois, Ollivier. — « Essai de culture de l'amibe dysentérique », *C. R. Soc. Biol.*, juin 1928, vol. 99, n° 92, p. 79-81.

Lesage. — « Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds », *C. R. Acad. Sciences.* CCXXXIX, 1904, p. 1237.

Mathis. — « Culture de l'amibe dysentérique », *Ann. Inst. Pasteur*, 1905, p. 91.

— « Culture facile de l'amibe du singe (type limax) », *Bull. Soc. Médico chirurgicale de l'Indochine*, p. 408, 1913.

— « Morphologie et cycle évolutif de l'amibe dysentérique », *Algérie médicale*, mai 1931, p. 155.

Meleney and **Frye.** — « Infection of kittens with Entamœba histolytia by divert injection of cultures into the ileum », *Proc. soc. Experimental Biol. and medecine*, dec. 1932, vol. 30, n° 2, p. 277

Menendez. — « Serological relationship of E. histolytica », *Amer. Journal of hyg.*, 33, p. 26, mai 1932, vol. 15, n° 3, p. 785-808.

Miller. — « Difficultés de la culture de l'entamœba histolytica », *Proc. Soc. Exp. biol. et med.*, juin 1928, vol. 25. nº 9, p. 762.

Mouton. (H.). — « Recherches sur la digestion des amibes et leurs diastases intracellulaires », *Ann. Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 457.

Musgrave et **Clegg**. — « Amœba : their cultivation and etiologic significance », *Bureau of Govern. Labor. Biol. labo, Manille*, 1904.

— « The cultivation and pathogenesis of amœba », *Philip. Journal of Science*, 1906, p. 909.

Nagahana (N.). — « The rat as a carrier of Entamœba histolytica. I. The morphology and cultivation of a histolytica-like amœba found in the wild-rat (mus norvegicus) », *The journal of the Chosen medical association*, vol. XXIV, nº 5, 20 mai 1934.

Nasset et **Kofoid**. — « Les effets du radium et du potassium mélangés à des métaux sensibilisants sur l'entamœba dysenteriae in vitro », *Univ. Cal Publ.*, 8 nov. 1928, vol. 31, nº 17, p. 387.

Noc (F.). — « Recherches sur la dysenterie amibienne en Cochinchine », *Ann. Inst. Pasteur*, XXIII, 1909, p. 177.

Paulson. — « An accurate method for the numerical determination of entamœba histolytica in vitro and its possible use with other intestinal protozoa », *Amer. journal Trop. Medecine*, sept. vol. 12, nº 5, p. 387-399.

Penfold (W. J.), **Woodcock** (H. M.) and **Drew** (A. H.). — « The excystation of E. histolytica (tetragena) as an indication of vitality of the cyst », *Brit. med. journal*, 1916, p. 714.

Poindexter. — « The Porto-Rico strain of E. histolytica. Comparaison of the diagnostic value of divert simear examination and cultivation with pathogenicity test », *P. R. Jl. of Public Health and Trop. Med.*, sept. 1933, vol. IX, nº 1, p. 31-36.

Pons. — « Culture de Blastocystis hominis », *Bull. Soc. Med. chir. de l'Indochine*, août 1925.

— « Essai de mise en culture d'Entamœba dysenteriae en partant du pus hépatique d'origine amibienne », *Bul. Soc. Path Exot.*, 13 nov. 1929, vol. XXII, nº 9, p. 768-770.

Puscharew. — « Zur technik der amœben studiums », *Zischr. f. Wiss. Mikr.*, XXVIII, 1911, p. 145-150.

Rees (C. W.). — « The infectivity and pathogenicity of a starch-fed strain of E. histolytica », *Il parasitology*, 1928, p. 15-131.

Reich (K.). — « Nouvelle méthode pour obtenir des cultures stériles », *Arch. fur Prolistenk*, 79-133.

Rogers. — « The rapia cure of amœbic dysentery and hepatitis by hypodermic injections of soluble salt of Emetine. Further experience of the specific curative action on amœbic disease of hypodermic injections of soluble salt of Emetine », *Brit. Med. Journal*, 1922, p. 1424.

Ross (R.) and **Thomson** (D.). — « Studies on Egyptian sand amœba », *Proc. R. Soc. Med.*, 1916, p. 35.

Saint John (J. H.). — *a*) « Differential characteristics of Amœba of man in culture », *American journal of med. trop.* 1926, VI, p. 319.

— *b*) « Practical value of examination for Entamœba histolytica by cultures », *Journal American med. Ass.*, LXXXVI, 1926, p. 1272.

— « The effect of Emetin on E. histolytica in culture », *American journal of Hygien*, t. XVIII, sept. 1933, vol. 18, n° 2, p. 414.

Sautet (J.). — « Action de l'amidon sur les cultures d'amibes », *Ann. de Parasit.*, IV, 1926, p. 345.

— « Recherches expérimentales sur quelques produits employés dans le traitement de la dysenterie amibienne », *Ann. de Parasit.*, V, 1927, p. 329.

— « Quelques remarques sur les cultures d'Entamœba dysentariae *Ann. de Parasit humaine et comparée*, janv. 1929, vol. 7, n° 1, p. 64-79.

— « Pouvoir pathogène des cultures d'Entamœba dysentariae faites en présence d'amidon de riz », *Ann. de Parasit. humaine et comparée*, mars 1929, vol. 7, n° 2, p. 140-141.

Scalas. — « Contributo alla studio della deviazione del complemento nella dissenteria amebica », *La riforma medica*, 1921, p. 103.

— « L'intradermo reactione nella disenteria amebica », *La riforma medica*, 1923, p. 967.

Schachsuwarly (N.). — « Influence de la concentration du milieu et du bactériophage sur E. histolytica en culture », *Arch. f. Sch. Trop. Hyg.*, mars 1929, vol. 33, n° 33, p. 129.

Schuurmann (J.), **Schurrmann** (A.), **Tenbohkel Stuinink**. — « Essai de culture pure des trichomonas intestinalis », *Ann. Inst. Pasteur*, XLI, 1927, p. 62.

Sellards. — « Immunity reactions with amœbae », *Philip. Jl. Sc., sec. B.*, 1911, 6, p. 281

Sellards et **Leiva** — « Experimental therapy of amœbic disentery », *Journ Phar. and Experimental therap.*, XXII, 1924, p. 687.

— « Instigations concernin the treatment of amœbic dysentery », *Philip. Jl. Sc* , XVII, 1923, p 37

Sherwood et **Heatman**. — « Studies on the antigenic properties of some free-living and pathogenic amœbas », *Amer. Jl. of Hyg.*, juillet 1932, vol. XVI, n° 1, p. 97.

Simitch (T. S.). — « Faut-il attribuer à l'amidon de riz la perte de l'action pathogène des amibes de culture », *Ann. de Parasit. humaine et comparée*, VIII, 1930, n° 6, p. 577-581.

— Action du froid sur les amibes en culture, *Ann. de Parasit. hum. et comparée*, VIII, 1930, p. 225, 230.

— « Présence de l'Entamœba dispar Brumpt dans le sud de la Yougo-Slavie », *Ann. Parasit. humaine et comparée*, 1er juillet 1931, vol. IX, n° 4, p. 289-302.

— « Infection expérimentale de l'homme par l'Entamœba dispar. », *Ann. Parasit. h. et comp.*, sept. 31, n° 5, p. 385-391.

— « L'Infection du chien par l'Entamœba dispar », *Ann. de Parasit. hum. et comp.*, nov. 31, n° 9, p. 497.

Spector. — « A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosing infection with E. histolytica », *Jl. Prev. med.*, mars 1932, vol. VI, n° 2, p. 117-128.

Svensson (R.) et **Linders** (F. J.). — « The chances of detecting infections with intestinal protozoa », *Acta medica. Scandinavia*, LXXXI, fasc. III, IV, p. 267-324.

Taliaffero et **Fisher**. — « The morphology of motile and enkysted E. Ranarum in culture », *Ann. trop. med. and parasitol.*, XX, 1926, p. 89.

Tanabe (M.) et **Chiba** (E.). — « On a new method of cultivation of dysentery amœbae », *Tokyo-ij-Shinshi* (*Tokyo med. News*), août 1928, n° 2586, n° 12, p. 325.

— « Un nouveau milieu de culture pour l'E. histolytica », *Acta Medica in Keijo*, 1928, vol. II, n° 3, p. 63-66.

Terrial. — *La recherche et le diagnostic parasitologique des protozoaires intestinaux en coprologie clinique*, thèse Paris, 1931.

Thomson et **Robertson**. — « Notes on the cultivation of certains amœba and flagellates of man, using the technic of Bœck and Drbohlav », *Jl. of Trop. med. and hyg.*, XXVIII, 1925, p. 343.

Titvinidze. — *Diagnostic of amwbic dysentery. Tropica P Diseases Bulletin*, 1933, p. 759.

Tsuchiya. — « A simple culture medium for E. histolytica », *Proc. Soc. Experiment. Biol. and Medecine*, janv. 1932, vol. 29, n° 4, p. 747-348.

Uihara (K.). — « Studien uber die amœben-dysenterie », *Zeitschr. fur Hygien*, LXXVII, 1914, p. 329.

Vedder. — « An experimental study of the action of ipecacuanha on amœba », *Far Eastern Association Trop. Medecine*, trans. second biennal congress held at Hong-Kong, 1912, p. 87.

Walker. — « The parasitic amœbae of the intestinal tract of man and other animals », *Jl. Med. Research*, XVII, p. 379, 1908.

— « Comparative study of the amœbae in the Manilla water supply, in the intestinal tract of healthy persons and in amœbic dysentery », *Philippine Jl. of Sc.*, section B (Medical science), vol. 6, n° 4, 1911.

Walker et **Sellards**. — « Experimental entamœbic dysentery », *The Philippine jl. of Sc.*, sect. B (Med. sc.), vol. 7, p. 253-1913.

Wasielewski. — « Uber amoben nachweiss », *Munchen Medic. wochs*, LVIII, 1914, p. 121.

Wasielewski et **Hirshfeld**. — « Zur technik der Amoben untersuchung *Hygien Rundschau*, XIX, 1909, p. 925.

Wells (R.). — « Aerial contaminations as the fallacy in the study of amœbic infections by the cultural methods », *Parasitology*, t. IV, 1911, p. 204.

Wells (R.) et **Grieg** (E.). — « Dysentery and liver abcess in Bombay »,

Sc. mem. by Off. of the med. and san. depart. of the Go. of India, Calcutta, 1911.

Wenyon. — *Protozoology*, Baillière, Tindall and C°, Londres, 1926.

Williams (A.). — « Pure culture of amœbae found in intestine of animals », Collected studies from the research labor. *Depl. of health, city of New-York*, VI, 1911, p. 298.

Williams (A. W.) et **Calkins** (G. N.). — « Cultural amœbae, A study in variation », *Jl. of Med. research*, XXIX, 1913, p. 43.

Wulker (G.). — « Der technik der amoben zuchtung », *Centralblatt fur bacteriol.* (I-ref.), L, p. 577, 1911.

Yorke et **Adams**. — I. « Development of cysts. Excystation and development of encysted amœba in vitro ».

— II. « Longevity of cysts in vitro and their resistance to heat and to various drugs and chemicals », *Ann. Trop. med. and parasit.*, XX, 1926, p. 279.

— *a*) Observation on Entamœba histolytica. Some factors governing development and excystation of the cysts in vitro, *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, XXI, 1927, p. 281.

— *b*) « Amœbic dysentery. Investigations into the life history of E. histolytica », *Brit. Med. Jl.*, 1927, p. 486.

Yoshida (K.). — « The encystment of dysentery Amœbae in vitro », *Jl. Exp. Med.*, XXVIII, 1918, p. 387.

— « Ueber die auskeimung der Cyste von E. tetragena und E. coli in vitro », *Mitt. d. med. Gesellsch., Tokio*, XXIII, 1919, p. 3.

— « Ueber die Encystierung der dysenterie Amœben in vitro », *Mitt. a. d. Med. Fac. d. Kais. Univ. Kyushu*, V, 1919, p. 49.

— « Reproduction in vitro of E. tetragena and E. Coli from their cysts », *Jl. Exp. med.*, XXXII, 1920, p. 357.

Yoshitake (Saigo). — « Preliminary report on the cultivation of Entamœba histolytica », *Taiwan Igakkai Zanshi* (*Jl. med. Ass. Formose*), janv., 1929, n° 286.

Bordeaux. — Imprimerie Bière, 18, rue du Peugue. — 1934.